

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 199 07 099 A 1**

51 Int. Cl.⁷:
C 07 H 21/00
C 12 N 15/16
C 12 N 15/55
A 61 K 48/00

21 Aktenzeichen: 199 07 099.7
22 Anmeldetag: 19. 2. 1999
43 Offenlegungstag: 7. 9. 2000

DE 199 07 099 A 1

71 Anmelder:
Theragene Biomedical Laboratories GmbH, 82152
Planegg, DE

74 Vertreter:
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln

72 Erfinder:
Hauser Funke, Charlotte, Dr., 80639 München, DE

56 **Entgegenhaltungen:**

US 57 56 264
US 56 88 677
US 55 97 693
US 55 80 722
WO 94 28 150 A1
WO 9 74 119 A1

Biochemistry 32(1993)11627-11637;
Biochemistry 30(1991)1628-1635;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 **Hormon-Hormonrezeptorkomplexe und Nukleinsäurekonstrukte und ihre Verwendung in der Gentherapie**

57 Die Erfindung stellt eine Stoffzusammensetzung bereit, die eine Nukleotidsequenz umfaßt, die wenigstens ein hormonresponsives Element (HRE) umfaßt, wobei dieses hormonresponsive Element an einem Hormon-Hormonrezeptorkomplex gekoppelt ist; des weiteren stellt sie Nukleinsäurekonstrukte bereit, die wenigstens ein hormonresponsives Element (HRE) umfassen, wobei das hormonresponsive Element ein Gen reguliert, das für einen menschlichen Gerinnungsfaktor kodiert und die Erfindung in der Gentherapie und besonders bei der Behandlung menschlicher Blutgerinnungsstörungen, wie z. B. Hämophilie, Anwendung findet.

DE 199 07 099 A 1

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

1. Gegenstand der Erfindung

Die Erfindung stellt eine Stoffzusammensetzung bereit, die eine Nukleotidsequenz enthält, welche mindestens ein hormonresponsives Element (HRE) umfaßt, wobei dieses hormonresponsive Element an einen Hormon-Hormonrezeptor-komplex gekoppelt ist. Sie betrifft ferner Nukleinsäurekonstrukte, die mindestens ein hormonresponsives Element umfassen, sowie Vektoren, die solche Konstrukte enthalten, worin das hormonresponsive Element ein Gen reguliert, welches für einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor kodiert. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte, Plasmide und Stoffzusammensetzungen kommen in der Gentherapie zur Anwendung, insbesondere in der Behandlung menschlicher Blutgerinnungsstörungen, beispielsweise Hämophilie. Sie können auch dazu verwendet werden, Zielgene herauf oder herunter zu regulieren, sowie um Impfstoffe zu verabreichen.

2. Zusammenfassung des Standes der Technik

Die Gentherapie stellt für zahlreiche Krankheiten und Defekte eine äußerst vielversprechende Methode dar. Allgemein gesprochen beinhaltet sie den Transfer rekombinanter Gene oder Transgene in somatische Zellen, um mit einem genetischen Defekt behaftete Proteine zu ersetzen oder den pathologischen Prozeß einer Krankheit zu beeinflussen. Ihrem Prinzip nach ist die Gentherapie eine einfache Methode. In der Praxis müssen noch viele Nachteile überwunden werden.

Die Forschung im Bereich der Gentherapie hat sich auf Wege konzentriert, DNA möglichst effektiv in Zellen eines Patienten zu inkorporieren. Gegenwärtig sind virale Vektoren die Träger, welche in klinischen Gentherapieansätzen gemeinhin verwendet werden. In puncto Genexpressionseffizienz haben die viralen Verabreichungssysteme große Vorteile im Vergleich zu Techniken, die DNA-Lipid-Formulierungen als Träger zur Verabreichung verwenden, oder im Vergleich zu mechanischen Methoden, beispielsweise der "gene gun". Obwohl es eine Vielfalt viraler Systeme gibt, die für gentherapeutische Strategien getestet wurden, sind retrovirale Vektoren und adenovirale Vektoren gegenwärtig die am meisten verwendeten Träger (Salmons, B. and Gunzburg, W.H., Hum. Gene Ther., Vol. 4, 129, 1993; Kasahara, N.A., et al., Science, Vol. 266, 1373, 1994; Ali, M., et al. Gene Ther., Vol. 1, 367, 1994). Dennoch haben diese Systeme große Nachteile, etwa die Möglichkeit viraler Kontamination. Andere Sicherheitsbedenken stehen nach wie vor der Entwicklung einer klinischen Anwendung der Gentherapie unter Verwendung dieser viralen Systeme im Wege. So weisen beispielsweise rekombinante Retroviren den Nachteil der zufälligen chromosomalen Integration auf, welche zur Aktivierung von Onkogenen oder zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen kann. Des weiteren hat die wiederholte Anwendung rekombinanter Adenoviren schwerwiegende immunologische Probleme verursacht (Elkon, K.B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94, 9814, 1997). Die humorale Antwort führte zur Produktion von Antikörpern gegen Adenovirusproteine, welche eine nachfolgende Infektion verhinderten. Immunsuppressive Medikamente können diese Wirkungen abschwächen, aber sie stellen für den Patienten eine zusätzliche Belastung dar (Dai, Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92, 1401, 1995).

Ein anderes virales Verabreichungssystem beruht auf dem adenoassoziierten Virus (AAV). Das AAV erfordert eine Koinfektion mit einem nicht verwandten Helfervirus. Obwohl solche rekombinanten AAV-Virionen sich für die Einführung zahlreicher kleiner Gensequenzen in Wirtszellen als nützlich erwiesen haben, so sind Genverabreichungssysteme, welche auf solchen Partikeln basieren, durch die verhältnismäßig kleine Größe der AAV-Partikel limitiert. Diese Eigenschaft vermindert die Bandbreite geeigneter genetischer Protokolle in hohem Maße. Darüber hinaus stellt die Notwendigkeit, ein Helfervirus einzusetzen, einen weiteren komplizierenden Faktor dieses Verabreichungssystems dar. (Muzyczka, N., Curr. Top. Microbiol. Immunol., Vol. 158, 97, 1992).

Nicht-virale Gentherapieansätze sind ebenfalls nicht zufriedenstellend, obwohl sie sicherer sind. Probleme im Zusammenhang mit ineffizienter Genverabreichung oder schwacher kontinuierlicher Expression stellen wesentliche Nachteile dar. Methoden wie beispielsweise die direkte Injektion von DNA in zelluläre Kompartimente bis hin zu Gemischen aus DNA und kationischen Lipiden oder Polylysin, welche einen leichteren Durchtritt des Transgens durch die Zellmembran erlauben, haben diese Hürden noch nicht überwunden. (Felgner, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, 7413, 1987; Behr, J.-P., Bioconjugate Chemistry, Vol. 5, 382, 1994).

Mit der Einführung nackter DNA (Polynukleotid-)Sequenzen (einschließlich Antisense-DNA) in Vertebraten ist eine kontrollierte Expression eines Proteins möglich. Es wird berichtet, daß eine Verabreichung der Polynukleotidsequenzen in Geweben wie beispielsweise Muskeln, Gehirn oder die Haut durch Injektion oder durch die Einführung in den Blutkreislauf erreicht werden kann. (Wolff, J.A., et al., Science, Vol. 247, 1990; Lin H., et al., Circulation, Vol. 82, 2217, 1990; Schwartz, B., et al., Gene Ther., Vol. 3, 405, 1996). Desweiteren wurde ein direkter Gentransfer in Säugetiere im Zusammenhang mit in Liposomen verkapselter DNA und mit DNA, die in Proteosomen eingeschlossen war, welche Rezeptorproteine enthielten, berichtet. Obwohl die Injektion nackter DNA zur Expression des Transgens führt, ist die Effizienz bei weitem nicht mit der von DNA-Verabreichungssystemen auf der Basis von Viren vergleichbar. Dennoch hat nackte DNA den Vorteil, daß mögliche pathogene Effekte ausbleiben. Eine Einschränkung der Methode der Injektion nackter DNA bedeutet die Tatsache, daß die Transgenexpression dosisabhängig ist. Die Genexpression kann einen Sättigungspunkt erreichen, und eine Zunahme der injizierten DNA-Menge führt zu einer verminderten Proteinproduktion pro Plasmid. Demzufolge kann die Proteinexpression dramatisch sinken, wenn die Menge an injizierter DNA oberhalb eines gewissen Schwellenwertes liegt.

Unter den genetischen Erkrankungen, welche der Fachmann sich mit Hilfe dieser Methoden des Stands der Technik zu überwinden bemüht hat, sind diejenigen, die im Zusammenhang mit Blutgerinnungsdefekten stehen, und insbesondere Hämophilie (Lozier, J.N. and Brinkhous, K.M., JAMA, Vol. 271, 1994; Hoebe, R.C., Biologicals, Vol. 23, 27, 1995). Hämophilie A und B beispielsweise sind X-gekoppelte, rezessive Blutungsstörungen, welche durch Defekte der Blutge-

rinnungsfaktoren VIII bzw. IX verursacht werden (Sadler, J.L. et al., in: The Molecular Basis of Blood Diseases, 575, 1987). Hämophilie tritt mit einer Häufigkeit von etwa eins zu 5000 bei männlichen Neugeborenen auf. Hämophiliepatienten leiden an exzessiven Blutungen infolge fehlender Blutgerinnung an Verwundungsstellen. Die Unfähigkeit zur richtigen Blutgerinnung bedingt auch Gelenkschäden sowie Schäden der inneren Gewebe und verursacht darüber hinaus Risiken im Zusammenhang mit der richtigen Behandlung von Schnitten.

Hämophilie A läßt sich durch Verabreichung des Blutgerinnungsfaktors VIII behandeln. Bis vor kurzem mußten Faktor VIII-Präparate durch die Konzentrierung von Spenderblut gewonnen werden, wodurch das Risiko einer Kontamination mit infektiösen Agentien, etwa HIV oder Hepatitis, gegeben war. Das Faktor VIII-Gen ist kloniert worden (z. B. Vehar et al., Nature, Vol. 312, 337, 1984), wodurch die Herstellung eines rekombinanten Produktes ermöglicht wurde. Obwohl Faktor VIII mittels rekombinanter Methoden in einer höheren Reinheit als aus den Blutkonzentraten bereitgestellt werden kann, erfordert die exogene Versorgung eines Patienten mit Faktor VIII noch immer die Verabreichung wiederholter Dosen während des gesamten Lebens des Patienten, eine unpraktische und teure Lösung. Andere Hämophilieformen schließen Hämophilie B ein, welche durch einen Defekt des für Faktor IX kodierenden Gens verursacht wird. Die oben beschriebenen Gentherapiesysteme wurden im Zusammenhang mit der Behandlung von Hämophilie A und B mit Faktor VIII bzw. IX bemüht (siehe z. B. WO 94/29471). Diese Systeme weisen jedoch die oben bereits diskutierten Nachteile auf.

Das klassische Modell der Hormonwirkung basiert auf dem Konzept der Bindungswechselwirkung des Hormons mit einem intrazellulären Rezeptor, welcher im Zytoplasma oder im Kern lokalisiert ist (Evans, R. Science, Vol. 240, 889, 1988). Diese intrazellulären Rezeptoren verbleiben im latenten Zustand bis sie ihrem jeweiligen Zielhormon ausgesetzt werden. Bei einer solchen Exposition verändert der Hormonrezeptor nach der Bindung des Hormons seine Konformation und transloziert in der aktivierten Form in den Zellkern, wo er als Dimer an hormonresponsive Elemente (HRE) in der Promotorregion hormonregulierter Gene bindet (Beato, M., Cell, Vol. 56, 335, 1989; O'Malley, B., et al., Biol. Reprod., Vol. 46, 163, 1992). Die HRE sind "enhancer"-Elemente, die sich gewöhnlich in der 5'-flankierenden Region des jeweiligen hormoninduzierten Gens befinden.

Der Steroidrezeptor stellt ein Beispiel für solche intrazellulären Rezeptoren dar. Steroidrezeptoren gehören zu einer Superfamilie ligandenabhängiger Transkriptionsfaktoren, für die eine einzigartige molekulare Struktur charakteristisch ist. Die zentral angeordnete, hoch konservierte, DNA-bindende Domäne definiert diese Superfamilie. Die zweite wichtige und vergleichsweise invariante Region ist die COOH-terminale Ligandenbindungsdomäne. Ein Beispiel für einen solchen Rezeptor ist der Progesteronrezeptor, der durch das Steroid Progesteron gesteuert wird. Bei dem Progesteronrezeptor wirkt Progesteron als natürlicher Agonist, und als solcher zeigt es starke anti-mineralokortikoide Eigenschaften sowohl auf der molekularen als auch auf der systemischen Ebene. Neben den klassischen Uteruseffekten wurden dem Progesteron in zahlreichen Studien auch anti-epileptische, anxiolytische, hypnotische und anästhetische Eigenschaften zugeordnet.

Methoden für die Verwendung von Rezeptormutanten, einschließlich Steroidrezeptormutanten für die Gentherapie, sind vorgeschlagen worden. Solche Methoden sind beispielsweise in WO 93/23431, WO 98/18925 und WO 96/40911 offenbart. WO 98/33903 offenbart ein genetisches Konstrukt, welches ein steroidresponsives Element eines gewebespezifischen Gens, eine kodierende Sequenz und einen SV40 "enhancer" umfaßt.

Kurze Beschreibung der Erfindung

Das Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, die Nachteile der früheren Gentherapieverabreichungssysteme zu überwinden. Das Verabreichungssystem gemäß der vorliegenden Erfindung ist eine Stoffzusammensetzung, die eine Nukleinsäure enthält, welche mindestens ein hormonresponsives Element (HRE) umfaßt, wobei dieses hormonresponsive Element an einen Hormon-Hormonrezeptorkomplex gekoppelt ist. Eine bevorzugte Ausführungsform der Stoffzusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung ist eine, in der das hormonresponsive Element ein steroidresponsives Element (SRE) und der Rezeptor ein Steroidrezeptor ist. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform ist das hormonresponsive Element ein progesteronresponsives Element (PRE) und der Rezeptor ist ein Progesteronrezeptor.

Die vorliegende Erfindung stellt ein Verabreichungssystem für die Gentherapie bereit, welches die Nachteile des Standes der Technik überwinden sollte. Das Vorhandensein des hormonresponsiven Elements in Verbindung mit der Nukleinsäure, die für ein interessierendes Gen kodiert, fördert und verstärkt die Genexpression und, was noch wichtiger ist, fördert das Binden eines Hormon-Hormonrezeptorkomplexes. Ein hormonresponsives Element ist bevorzugt in Form einer dimeren oder multimeren Nukleinsäuresequenz vorhanden. Sogar eine inverse Orientierung des hormonresponsiven Elements wird zu dessen richtiger Funktion führen. Der Hormon-Hormonrezeptorkomplex enthält einen Hormonrezeptor, der nach Bindung seines spezifischen Hormons aktiviert wird. In aktivierter Form ist der Hormonrezeptor in der Lage, sein spezifisches hormonresponsives Element, das gemäß der vorliegenden Erfindung mit einer Nukleinsäure kombiniert ist, die das erwünschte Gen, beispielsweise einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor enthält, zu erkennen und daran zu binden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Nukleinsäurekonstrukt, das mindestens ein hormonresponsives Element (HRE) enthält und insbesondere mindestens ein hormonresponsives Element für die Regulation eines Gens, das für einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor kodiert. Eine bevorzugte Ausführungsform ist eine, in der das hormonresponsive Element ein steroidresponsives Element (SRE) ist. In einer besonders bevorzugten Form ist das hormonresponsive Element ein progesteronresponsives Element (PRE).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung sind Vektoren, die die Nukleinsäurekonstrukte gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten. Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung schließen desweiteren transfizierten und transformierten Zellen ein, welche diese Vektoren und/oder Nukleinsäuren enthalten.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind pharmazeutische Zusammensetzungen, die eine therapeutisch wirksame Dosis der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte sowie ein Hormon enthalten. Das Hormon ist vorzugsweise ein Steroid, besonders bevorzugt Progesteron. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung

der Stoffzusammensetzungen und Nukleinsäurekonstrukte als Medikamente gegen genetische Defekte und Erkrankungen, beispielsweise Hämophilie, sowie die Verwendung der Stoffzusammensetzungen und Nukleinsäurekonstrukte für die Herstellung eines Medikamentes gegen genetische Defekte und Erkrankungen, beispielsweise Hämophilie.

Die Erfindung beinhaltet ferner ein Verfahren zur Einführung eines Nukleinsäurekonstruktes, das für ein interessierendes Gen, beispielsweise einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor, kodiert, in eine Zelle, um das interessierende Gen in der Zelle zu exprimieren. Dieses Verfahren bringt eine Nukleinsäure in die Zelle ein (beispielsweise mittels eines Vektors), so daß die Zelle das Gen, für das die fremde Nukleinsäure kodiert, exprimiert. Bei diesem Verfahren wird die Nukleinsäure, welche für das Gen, beispielsweise einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor, kodiert, mit einem Nukleinsäurekonstrukt kombiniert, welches mindestens ein hormonresponsives Element (HRE), bevorzugt ein progesteronresponsives Element, enthält. Das Vorhandensein des hormonresponsiven Elements in Verbindung mit der Nukleinsäure, welche für das Gen, beispielsweise einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor, kodiert, fördert und verstärkt die Genexpression und fördert die Bindung eines Hormon-Hormonrezeptorkomplexes in der Zielzelle.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Behandlung eines Blutgerinnungsdefektes durch Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge der erfindungsgemäßen Stoffzusammensetzung an einen Organismus.

Eine weitere Ausführungsform gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren stellt die Impfung dar. Die Einführung eines Nukleinsäurekonstruktes oder einer Stoffzusammensetzung der Erfindung, die ein Gen für ein Antigen oder virale Sequenzen enthält, in eine Zelle (DNA oder mRNA-Impfstoffe) unter Verwendung des oben erwähnten Verfahrens kann auch einen Weg darstellen, um die zelluläre Immunantwort zu stimulieren.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

Abb. 1 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG1.

Abb. 2 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG4.

Abb. 3 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG5.

Abb. 4 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG6.

Abb. 5 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG7.

Abb. 6 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG8.

Abb. 7 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG9.

Abb. 8 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG11.

Abb. 9 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG11.

Abb. 10 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG13.

Abb. 11 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG14.

Abb. 12 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG15.

Abb. 13 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG16.

Abb. 14 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG18.

Abb. 15 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG19.

Abb. 16 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG20.

Abb. 17 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG21.

Abb. 18 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG22.

Abb. 19 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG23.

Abb. 20 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG24.

Abb. 21 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG25.

Abb. 22 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG26.

Abb. 23 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG27.

Abb. 24 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG28.

Abb. 25 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG29.

Abb. 26 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG30.

Abb. 27 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG31.

Abb. 28 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG32.

Abb. 29 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG33.

Abb. 30 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG2.

Abb. 31 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG34.

Abb. 32 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG35.

Abb. 33 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG36.

Abb. 34 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG37.

Abb. 35 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG38.

Abb. 36 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG53.

Abb. 37 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG64.

Abb. 38 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG0.

Abb. 39 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG66.

Abb. 40 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG67.

Abb. 41 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG68.

Abb. 42 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG69.

Abb. 43 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG82.

Abb. 44 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG95.

Abb. 45 ist die DNA-Sequenz des Vektors pTGFG36 (SEQ ID No. 1).

Abb. 46 ist die DNA-Sequenz des Vektors pTGFG67 (SEQ ID No. 2).

Abb. 47 zeigt eine GFP-Konzentrationskurve für Zellhomogenisate nach der Transfektion mit pTGFG5 bzw.

pTGF α G20.

Abb. 48 zeigt korrespondierende licht- (a und c) und fluoreszenzmikroskopische (b und d) Aufnahmen von HeLa-Zellen nach der Transfektion mit pTGF α G5 (a und b) bzw. pTGF α G20 (c und d).

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

5

1. Definitionen

"Nukleinsäure" bedeutet DNA, cDNA, mRNA, tRNA. Die Nukleinsäure kann linear oder zirkulär, doppel- oder einzelsträngig sein.

10

"Nukleinsäurekonstrukt" bezieht sich auf einen Verbund sich aufeinander beziehender Nukleinsäureelemente. Die Nukleinsäureelemente des Konstruktes können in einer solchen Orientierung in einem Vektor inkorporiert sein, daß das interessierende Gen transkribiert werden kann und, wenn erwünscht, ein erwünschtes Protein exprimiert werden kann.

"Hormonresponsives Element" (HRE) bezieht sich auf Nukleinsäure- und insbesondere DNA-Bereiche, die als Folge der Hormonaktivierung die Transkription von Genen regulieren. Typischerweise haben HREs eine Länge von etwa 10-40 Nukleotiden, und insbesondere von etwa 13-20 Nukleotiden. Wie oben erklärt, werden HREs aktiviert, wenn ein Hormon an seinen korrespondierenden intrazellulären Rezeptor bindet und eine Konformationsänderung verursacht, so daß der Rezeptor eine erhöhte Affinität für das HRE aufweist und daran bindet. Das HRE wiederum stimuliert die Transkription. Ein "steroidresponsives Element" (SRE) ist ein HRE, das als Antwort auf die Steroidaktivierung die Transkription von Genen reguliert. Ein "progesteronresponsives Element" (PRE) ist ein HRE/SRE, das die Transkription von Genen als Folge der Progesteronaktivierung reguliert.

15

20

"Hormonrezeptor" bezieht sich auf einen Rezeptor, der an ein Hormon bindet oder durch ein Hormon aktiviert wird. "Steroidrezeptor" bezeichnet einen Rezeptor, der an ein Steroidhormon bindet oder durch dieses aktiviert wird. Ein "Progesteronrezeptor" ist ein Rezeptor, der an das Steroidhormon Progesteron bindet oder durch dieses aktiviert wird.

"Gen" bezeichnet DNA, die an der Expression eines Polypeptids beteiligt ist, welches wahlweise "leader" und "trailer" Sequenzen, sowie Introns und Exons enthalten kann.

25

"Vektor" bezeichnet jedwedes genetische Konstrukt, etwa ein Plasmid, einen Phagen, ein Kosmid etc., das replizieren kann, wenn es mit den richtigen Kontrollelementen assoziiert ist und das Gensequenzen zwischen Zellen transferieren kann. Dieser Begriff umfaßt Klonierungs- und Expressionsvehikel.

"Promotor" bezeichnet eine Region regulatorischer DNA-Sequenzen für die Kontrolle der Gentranskription, an welche die RNA-Polymerase bindet. Der Promotor bildet mit RNA-Polymerase einen Initiationskomplex, um die Transkription zu initiieren und anzutreiben. "Enhancer" können den Komplex aktivieren, oder "silencer" können ihn inhibieren. Ein "gewebespezifischer Promotor" ist ein Promotor, welcher in der DNA eines Gewebes für die Transkription von Genen, die in spezifischen Geweben exprimiert werden, gefunden wird.

30

"Therapeutisch wirksame Dosis" der erfindungsgemäßen Produkte bezeichnet eine Dosis, die zum Zwecke der Behandlung oder der Prophylaxe wirksam ist, beispielsweise eine Dosis, welche eine wirksame Behandlung oder Verminderung der Symptome der Hämophilie herbeiführt. Sie ist ferner eine Dosis, welche die Expression eines Zielgenes meßbar aktiviert, was durch Messungen der Spiegel des Zielproteins bestimmt werden kann, oder eine Dosis, von der man durch Extrapolation von in-vitro- oder in-vivo-Daten vorhersagen kann, daß sie zum Zwecke der Behandlung oder der Prophylaxe wirksam sein wird. Die Bestimmung einer therapeutisch wirksamen Dosis liegt innerhalb des Erfahrungsreichs des Fachmanns.

35

40

"Kodiert" oder "kodierend" bezieht sich auf eine Nukleinsäuresequenz, welche (im Falle von DNA) transkribiert oder (im Falle von mRNA) in vitro oder in vivo in ein Polypeptid translatiert wird, wenn sie unter die Kontrolle geeigneter regulatorischer Sequenzen gesetzt wird.

Im Sinne dieser Anmeldung bezieht sich "exprimieren", "exprimierend" oder "Expression" auf die Transkription und Translation eines Genes, das für ein Protein kodiert.

45

2. Detaillierte Beschreibung und Beispiele

Wie oben gesagt, besteht eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, ein neues und verbessertes Verabreichungssystem für die Gentherapie bereitzustellen. So stellt die Erfindung in einer Ausführungsform eine Stoffzusammensetzung bereit, die eine Nukleinsäure enthält, welche mindestens ein hormonresponsives Element (HRE) umfaßt, wobei dieses hormonresponsive Element an einen Hormon-Hormonrezeptorkomplex gekoppelt ist. Eine bevorzugte Ausführungsform der Stoffzusammensetzung der Erfindung ist eine, in der das HRE ein steroidresponsives Element (SRE) und der Rezeptor ein Steroidrezeptor ist. Besonders bevorzugt ist ein progesteronresponsives Element (PRE) als hormonresponsives Element und ein Progesteronrezeptor als Rezeptor.

50

55

HREs, die sich potentiell in der vorliegenden Erfindung verwenden lassen, sind bereits beschrieben worden, beispielsweise GREs (Scheidereit, C., et al., Nature, Vol. 304, 749, 1983; von der Ahe, D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, 2817, 1986), EREs oder PREs (Chambon, P., et al., Rec. Prog. Horm. Res., Vol. 40, 1, 1984; Klock, G., et al., Nature, Vol. 329, 734, 1987). Es wurde oben bereits festgestellt, daß erfindungsgemäß das am meisten bevorzugte HRE ein PRE ist. Insbesondere ist das PRE bevorzugt, welches in Beispiel 1 beschrieben ist. Die Nukleinsäure, welche erfindungsgemäß verwendet wird, enthält mindestens ein hormonresponsives Element. Bevorzugt ist eine Nukleinsäure, welche ein HRE enthält, sie kann aber auch mehr als ein HRE enthalten. So kann die Nukleinsäure beispielsweise 3 oder 5 HREs enthalten. Die am meisten bevorzugte Ausführungsform ist eine Nukleinsäure, welche ein PRE enthält.

60

Hormonrezeptoren, die sich potentiell in der vorliegenden Erfindung verwenden lassen, sind beispielsweise Östrogenrezeptoren, Mineralkortikoidrezeptoren, Glukokortikoidrezeptoren, Retinsäurerezeptoren, Androgen-, Calcitriol-, Schilddrüsenhormon- oder Progesteronrezeptoren, sowie "orphan"-Rezeptoren. Solche Rezeptoren sind in der Vergangenheit beschrieben worden (Green, S., et al., Nature, Vol. 320, 134, 1986; Green, G.L., et al., Science, Vol. 231, 1150,

65

1986; Arriza, J.L., et al., Science, Vol. 237, 268, 1987; Hollenberg, S.M., et al., Nature, Vol. 318, 635, 1985; Petkovitch, M., et al., Nature, Vol. 330, 444, 1987; Giguere, V., et al., Nature, Vol. 330, 624, 1987; Tilley, W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, 327, 1989; Baker, A.R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, 3294, 1988; Weinberger, C., et al., Nature, Vol. 324, 641, 1986; Sap, J., et al., Nature, Vol. 324, 635, 1986; Misrahi, M., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 143, 740, 1987; Kastner, P., et al., Cell, Vol. 83, 859, 1995). Diese Rezeptoren können von Menschen oder von anderen Säugetieren stammen, obwohl menschliche bevorzugt sind. Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen menschlicher Steroidrezeptoren sind in der GenBank erhältlich: Mineralcortikoidrezeptor: M16801; Glukokortikoidrezeptor α : M10901; Glukokortikoidrezeptor α_2 : U01351; Glukokortikoidrezeptor β : M11050; Retinsäurerezeptor α : AF088888 (Exon 1), AF088889 (Exon 2), AF088890 (Exon 3), AF088891 (Exon 4), AF088892 (Exon 5 und 6), AF088893 (Exon 7), AF088894 (Exon 8), AF088895 (Exon 9 und die komplette cDNA); Retinsäurerezeptor γ : M24857; Androgenrezeptor: M27423 (Exon 1), M27424 (Exon 2), M27425 (Exon 3), M27436 (Exon 4), M27427 (Exon 5), M27428 (Exon 6), M27429 (Exon 7), M27430 (Exon 8); Schilddrüsenhormonrezeptor α_1 : J03239; Progesteronrezeptor: AF016381; Somatotropinrezeptor: J00148; Vitamin D-Rezeptor (Calcitriolrezeptor): J03258.

Der Fachmann wird verstehen, daß die Rezeptorproteine mittels Standardmethoden exprimiert werden können, beispielsweise durch PCR-Klonierung der bekannten cDNAs aus cDNA-Banken und Überexpression der korrespondierenden Proteine in geeigneten Expressionsvektoren, wie beispielsweise in den Vektoren der vorliegenden Erfindung, in geeigneten Wirtszellen, beispielsweise COS-Zellen. In entsprechender Weise kann eine nachfolgende Aufreinigung der zytosolischen Fraktion mittels Routinemethoden wie beispielsweise durch Affinitätschromatographie-Aufreinigung erzielt werden. Zu diesem Zweck sind diverse geeignete Antikörper gegen den erwünschten Rezeptor kommerziell erhältlich. So lassen sich beispielsweise polyklonale Antikörper gegen den Mausprogesteronrezeptor, welche eine ausreichend hohe Kreuzreaktivität für das menschliche Protein aufweisen, von Dianova (Hamburg, Deutschland) beziehen. Weitergehende Aufreinigung kann ebenfalls mit Standardmethoden erzielt werden, beispielsweise mittels chromatographischer Methoden wie etwa Ionenaustauschchromatographie und/oder FPLC.

Der am meisten bevorzugte Rezeptor ist der Progesteronrezeptor. Bevorzugterweise ist der Rezeptor ein humaner Progesteronrezeptor. Solch ein humaner Progesteronrezeptor (aus menschlichen T47D Brustkrebszellen) ist in dem US Patent Nr. 4.742.000 offenbart, und Zellen, welche diesen Rezeptor exprimieren, sind hinterlegt (ATCC Hinterlegungsnummer HTB, 133). Wie oben bereits beschrieben, wäre eine Aufreinigung eines solchen Rezeptors aus dem Zytosol mit Hilfe rezeptorspezifischer Antikörper eine Routineangelegenheit. Desweiteren offenbart das US Patent Nr. 4.742.000 ein Verfahren zur Aufreinigung des humanen Progesteronrezeptors mittels eines spezifischen Steroidaffinitätscharzes (vgl. Grandics et al., Endocrinology, Vol. 110, 1088, 1982). Kurz gesagt wird die zytosolische Fraktion der T47D-Zellen dabei über Sterogel gegeben, ein kommerzielles Präparat aus Desoxycorticosteron, das an Sepharose 2B gekoppelt ist und den Progesteronrezeptor selektiv bindet. Nach Waschschritten mit Auftragspuffer wird der gebundene Rezeptor mit einem Progesteron enthaltenden Puffer eluiert. Der eluierte Steroidrezeptorkomplex wird dann auf DEAE-Biogel chromatographiert und schrittweise mit einem 0,2 molaren NaCl-Puffer eluiert. Danach läßt sich das gebundene Progesteron leicht austauschen. Wie oben beschrieben, läßt sich eine weitere Aufreinigung mittels Routinemethoden, die dem Fachmann wohl bekannt sind, erzielen.

Mutierte Versionen dieser Rezeptoren und deren Derivate, die sich die Funktion der Rezeptoren aufweisen, einen Liganden zu binden und dadurch aktiviert zu werden, und welche DNA binden und die Transkription regulieren, können ebenfalls in der Erfindung eingesetzt werden. Solch ein Derivat kann ein chemisches Derivat sein, eine Variante, sowie eine Chimäre, Hybrid, Analog oder ein Fusionsprodukt.

Das Hormon in der Stoffzusammensetzung kann synthetische oder natürliche Hormone umfassen, etwa Östrogen, Testosteron, Glukokortikoid, Androgen, Schilddrüsenhormon, Progesteron oder Derivate hiervon. Diese sind allgemein erhältlich. Progesteron ist am meisten bevorzugt. So wird natürliches mikronisiertes Progesteron beispielsweise seit 1980 in Frankreich unter dem Markennamen UTROGESTAN® vertrieben. Seine Eigenschaften sind denen des endogenen Progesterons ähnlich, insbesondere weist es antiöstrogene, gestagene, schwach antiandrogene und antimineralcortikoid Eigenschaften auf.

Mikronisiertes Progesteron besitzt Vorteile, welche es zu einem geeigneten Träger machen, um Gene oder Nukleinsäurekonstrukte in ihre Zielzellen zu bringen. Insbesondere führt der synergistische Effekt des doppelten Prozesses einer Mikronisierung und Suspension in langkettigen Fettsäuren zu einer erhöhten Progesteronabsorption. Es ist gezeigt worden, daß nach oraler Verabreichung von 100 mg UTROGESTAN® maximale Plasma-Progesteronspiegel in den meisten Fällen nach 1 bis 4 Stunden erreicht wurden (Padwick, M.L., et al., Fertil. Steril., Vol. 46, 402, 1986). Danach sanken die Spiegel stark ab, obwohl sie nach 12 Stunden noch erhöht waren. Sogar nach 84 Stunden lagen die Spiegel noch etwas über dem Ausgangswert. Eine Kinetikstudie in den USA hat frühere Ergebnisse bestätigt, welche die Bioverfügbarkeit oral aufgenommenen mikronisierten Progesterons gezeigt hat. Es wurde dort gezeigt, daß nach zwei Stunden ein Maximum erreicht wird und daß danach der Plasma-Progesteronspiegel schnell sinkt (Simon, J.A., et al., Fertil., Steril., Vol., 60, 26, 1993).

Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von Progesteron als Trägersubstanz besteht darin, daß es nur geringe unerwünschte Nebenwirkungen hat. Oral verabreichtes Progesteron hat weder auf Plasmalipide (Jensen, J. et al., Am. J. Obstet. Gynecol., Vol. 156, 66, 1987) noch auf den Kohlenhydratstoffwechsel (Mosnier-Pudar, H. et al., Arch. Mal. Coeur, Vol. 84, 1111, 1991) einen ungünstigen Einfluß. Desweiteren wirken sich tägliche Progesterondosen von 200 mg und 300 mg nicht auf Leberenzyme (ASAT, ALAT, AFOS), die Synthese von Geschlechtshormon bindendem Globulin (SHBG) oder auf die HDL-Cholesterinspiegel aus. Obwohl die Desoxykortikosteron-Plasmaspiegel während der Behandlung mit UTROGESTAN® wesentlich steigen können, gibt es deutliche Hinweise darauf, daß die mineralcortikoiden Effekte dieses Progesteronmetaboliten durch die antimineralcortikoiden Effekte des Progesterons selbst vollständig kompensiert werden. Dies wird aus einer Vergleichsstudie ersichtlich (Corvol, P., et al., In: Progesterone and progestins. Raven Press, New York, 179, 1983), in der oral verabreichtes UTROGESTAN® die mineralcortikoiden Effekte von 9- α -Fluorohydrokortison ausgleichen konnte.

Dem Fachmann wird klar sein, daß die Zusammensetzung weitere Komponenten enthalten kann, welche das Einbringen der Nukleinsäure in eine Zelle zum Zwecke der Genthherapie unterstützen können. Insbesondere kann die Zusammensetzung auch β -Cyclodextrin, Glycerin, Lecithin oder Maiskeimöl enthalten. Beispielsweise kann die Zusammensetzung des erfindungsgemäßen Hormon-Hormonrezeptor-Nukleinsäurekomplexes Menschen oder Tieren oral in Form einer Gelatinekapsel verabreicht werden. Darin könnte Progesteron in einer 35% oder 40% β -Cyclodextrinlösung oder in Maiskeimöl oder Glycerin mit Erdnußöl in Verbindung mit Lecithin in einer Konzentration von 200-300 mg vorhanden sein.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Nukleinsäurekonstrukt, welches mindestens ein hormonresponsives Element (HRE) enthält, und insbesondere mindestens ein HRE zur Regulation der Expression eines Gens wie etwa, zum Beispiel, eines Gens, das für einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor kodiert. Eine bevorzugte Ausführungsform besteht dann, daß das hormonresponsive Element ein steroidresponsives Element (SRE) ist. Das hormonresponsive Element ist besonders bevorzugt ein progesteronresponsives Element (PRE). Dieses Nukleinsäurekonstrukt kann als Nukleinsäure in der Stoffzusammensetzung des ersten Aspektes der Erfindung verwendet werden.

Neben den oben bereits beschriebenen HRES, SREs oder PREs kann die Nukleinsäure der vorliegenden Erfindung ferner Promotor-, "enhancer"- oder "silencer"-Sequenzen enthalten. Der Promotor kann ubiquitär oder gewebespezifisch sein. Von den ubiquitären Promotoren ist der CMV-Promotor am meisten bevorzugt. Ein gewebespezifischer Promotor wird jedoch gegenüber einem ubiquitären Promotor bevorzugt. Gewebespezifische Promotoren, die man sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung vorstellen kann, schließen beispielsweise α_1 -Antitrypsin ein. Das Nukleinsäurekonstrukt kann ferner zusätzliche Sequenzen wie z. B. das Ampicillin-Resistenzgen enthalten. Andere, dem Fachmann bekannte Reporter-Sequenzen können ebenfalls enthalten sein, wie etwa, z. B., das grüne Fluoreszenzprotein (GFP), Luciferase, β -Galactosidase oder Chloramphenicoltransferase (CAT). Als Enhancersequenz sind das SV40-Intron und das SV40-Poly-A besonders bevorzugt. Ein bevorzugtes Nukleinsäurekonstrukt enthält nacheinander vom 5'- zum 3'-Ende: ein PRE, ein CMV-Promotor, ein interessierendes Gen, das SV40-Intron und eine SV40-Poly-A-Enhancersequenz und ein Ampicillin-Resistenzgen.

Das interessierende Gen kann ausgewählt werden aus denen, welche für Proteine kodieren, die in verschiedenen genetischen Defekten fehlen oder an Zuständen beteiligt sind, die im Zusammenhang mit unverhältnismäßigen Antworten auf Hormonsignale stehen, beispielsweise hormonabhängige Krebsformen wie etwa Brustkrebs, Eierstockkrebs und endometriale Krebsformen sowie Prostatakrebs. Das interessierende Gen kann auch dazu verwendet werden, ein defektes Gen, welches zu genetischen Erkrankungen wie Hämophilie, der von Willebrand-Erkrankung oder zystischer Fibrose führt, zu ersetzen. Das interessierende Gen umfaßt auch Mutationen solcher Gene oder ein Gen, welches für ein Fusionsprodukt kodiert. Das Nukleinsäurekonstrukt der vorliegenden Erfindung kann mehr als ein interessierendes Gen umfassen.

Insbesondere kann das interessierende Gen Gene für einen Blutgerinnungsfaktor, vorzugsweise einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor, ersetzen. Die Gene, die für Faktor VIII und Faktor IX kodieren, welche im Zusammenhang mit Hämophilie A bzw. B stehen, sind gute Kandidaten für die Erfindung. Andere Kandidaten schließen das Gen, das für von Willebrand-Faktor, Faktor N, Faktor X oder Protein C kodiert, mit ein.

Andere nützliche Gene schließen, ohne auf diese beschränkt zu sein, Gene für Hormone mit ein, wie etwa die Gene, die für Insulin, Parathormon, Luteinisierendes Hormon Releasing Factor (LHRH), Alpha- und Beta-Seminalinhibin und menschliches Wachstumshormon kodieren; Hormonrezeptorgene wie den Glukokortikoidrezeptor, den Östrogenrezeptor, den Progesteronrezeptor, den Retinsäurerezeptor; Wachstumsfaktoren wie etwa vascular endothelial growth factor (VEGF), nerve growth factor, epidermal growth factor; Gene für Enzyme; Gene, die für Zytokine oder Lymphokine wie z. B. Interferon kodieren, granulocytic macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), colony stimulating factor-1 (CSF-1), tumor necrosis factor (TNF), sowie Erythropoietin (EPO); Gene, die für Inhibitorsubstanzen wie etwa α_1 -Antitrypsin kodieren und Gene, die für Substanzen kodieren, die als Medikamente wirken, beispielsweise Gene, die für die Diphtherie- und Cholera-Toxine, Rizin oder Kobragift (cobra venom factor) kodieren. Des weiteren können auch Antisense-Sequenzen als genetisches Material verabreicht werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Vektoren, die die Nukleinsäurekonstrukte der vorliegenden Erfindung enthalten. Diese Vektoren können in der Stoffzusammensetzung der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Vorzugsweise ist die Nukleinsäuresequenz, die in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, jedoch linear anstatt zirkulär. Die Vektoren können zur transienten, permanenten oder episomalen Expression der Nukleinsäure in dem Nukleinsäurekonstrukt in der Lage sein. Wie oben erwähnt, kann das Nukleinsäurekonstrukt ferner zusätzliche Elemente enthalten.

Ausführungsformen der Erfindung schließen ferner transfigierte und transformierte Zellen, die diese Vektoren und/oder Nukleinsäurekonstrukte enthalten, mit ein. Im Zusammenhang mit dieser Erfindung ist eine transfigierte Zelle eine solche, in die Fremd-DNA inkorporiert worden ist. Transfektionsmethoden können Mikroinjektion, CaPO_4 -Fällung, Elektroporation, Liposomenfusion, oder Methoden mittels der "gene gun" einschließen. Am meisten bevorzugt ist die Transfektion mittels Elektroporation.

Transformation bezeichnet das Einbringen genetischen Materials in eine Zelle, etwa die erfindungsgemäßen Vektoren oder Nukleinsäurekonstrukte, wodurch die Zelle transient, stabil, oder permanent so verändert wird, daß sie ein spezifisches Genprodukt exprimiert oder auf eine andere Weise hinsichtlich ihrer Expression verändert ist. Transformation kann durch in vivo oder in vitro Techniken erreicht werden, obgleich eine in vivo Transformation bevorzugt ist.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind pharmazeutische Zusammensetzungen, die eine therapeutisch wirksame Dosis der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte und ein Hormon enthalten. Das Hormon ist vorzugsweise ein Steroid, und Progesteron ist, wie oben beschrieben, besonders bevorzugt. Die Dosis ist abhängig von dem zu behandelnden Zustand, den Parametern des Patienten und dem angestrebten Ergebnis. Die Bestimmung der Dosis liegt innerhalb des Erfahrungsbereichs des Fachmanns.

Die pharmazeutische Zusammensetzung (bzw. die Stoffzusammensetzung, das Nukleinsäurekonstrukt oder der Vektor) der vorliegenden Erfindung kann oral, intravenös, intramuskulär, subkutan, topisch oder durch die "gene gun" ver-

abreicht werden. Bevorzugt ist die orale Verabreichung unter Verwendung eines mikronisierten Hormons. Die Verabreichung kann systemisch erfolgen oder auf ein bestimmtes Gewebe abzielen.

Die Erfindung umfaßt ferner ein Verfahren zur Einführung eines Nukleinsäurekonstruktes, das für ein interessierendes Gen, beispielsweise einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor, kodiert, in eine Zelle, um den Blutgerinnungsfaktor in dieser Zelle zu exprimieren. Bei diesem Verfahren wird die Nukleinsäure, die für einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor kodiert, mit einem Nukleinsäurekonstrukt kombiniert, das mindestens ein hormonresponsives Element (HRE), vorzugsweise ein progesteronresponsives Element, umfaßt.

Die Mischung der Nukleinsäure, welche an den Hormon-Hormonrezeptorkomplex gebunden ist, mit einem Überschuß des Hormons, vorzugsweise Progesteron, wird verwendet, um die Nukleinsäure mittels verschiedener Methoden, die dem Fachmann bekannt und oben unriß sind, in eine Zelle zu bringen. Die Aufnahme in die Zelle wird durch die Wechselwirkung des Hormons auf der Ebene der Zellmembran stimuliert. Das Hormon oder Steroid interagiert mit der Lipiddoppelschicht der Zellmembran nicht nur aufgrund der Perturbation der Membran; sondern auch durch Aktivierung bestimmter hormon- oder steroidsensitiver Membranrezeptoren. Dies ist für Progesteron und andere Steroide nachgewiesen worden. Ferner ist es auch bekannt, daß Hormone mittels Diffusion die Zellmembran passieren können. In der vorliegenden Erfindung sollte die Nukleinsäure, die an den Hormon-Hormonrezeptorkomplex gebunden ist, im Zuge des Diffusionsprozesses durch die Membran transportiert werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Behandlung eines Blutgerinnungsdefektes, durch Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Dosis der erfindungsgemäßen Stoffzusammensetzung an einen Organismus. Dieses Verfahren beinhaltet die bereits diskutierten Überlegungen hinsichtlich der Verabreichung und der Dosierung.

Zur Illustration der technischen Aspekte der vorliegenden Erfindung wurden Experimente durchgeführt. Diese Experimente sind in den Beispielen II bis IV beschrieben.

Im folgenden wird die vorliegende Erfindung anhand von Beispielen erläutert. Der Fachmann wird leicht erkennen, daß die Erfindung nicht auf diese Beispiele beschränkt ist.

Beispiel I

Konstruktion der Vektoren

Herstellung des Vektors pTGFG1

Der Vektor pUC19 (MBI Fermentas) wurde mit XbaI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und religiert. Dieser XbaI-deletierte Vektor wurde dann mit EcoRI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und religiert, um die EcoRI-Schnittstelle zu deletieren. Um eine XbaI Schnittstelle in die SacI-Schnittstelle dieses Vektors einzufügen, wurde dieser mit SacI verdaut, mit T4-Polymerase behandelt, mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und mit dem XbaI-Linker CTCTAGAG (Biolabs #1032) ligiert. Eine weitere XbaI-Schnittstelle wurde dadurch eingeführt, daß der neu hergestellte Vektor mit HindIII verdaut wurde, mit Klenow behandelt, mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und mit dem XbaI-linker CTCTAGAG (Biolabs #1032) ligiert wurde. Dieser Vektor wurde pUC19/X genannt.

Um die XbaI-Schnittstelle in dem Vektor pHGF-S65T (Clontech) zu deletieren, wurde dieser Vektor mit XbaI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und zu dem so erhaltenen Vektor pGFP/0 religiert. Ein 2,3 kb Fragment, welches das GFP-Gen enthielt, wurde isoliert, nachdem pGFP/0 mit MluI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit BamHI verdaut worden war. Dieses Fragment wurde in den multiplen Klonierungsbereich des Vektors pUC19/X eingefügt, nachdem dieser mit SalI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit BamHI verdaut worden war. Der resultierende Vektor wurde pTGFG1 benannt (Abb. 1).

Herstellung des Inserts PRE (ds)

Die Oligonukleotide (Metablon) PRE-S (5'-GGG GTA CCA GCT TCG TAG CTA GAA CAT CAT GTT CTG GGA TAT CAG CTT CGT AGC TAG AAC ATC ATG TTC TGG TAC CCC-3') (SEQ ID No. 3) und PRE-AS (5'-GGG GTA CCA GAA CAT GAT GTT CTA GCT ACG AAG CTG ATA TCC CAG AAC ATG ATG TTC TAG CTA CGA AGC TGG TAC CCC-3') (SEQ. ID No. 4) wurden hybridisiert und mittels Kinase Reaktion phosphoryliert, wodurch die Inserts PRE (ds) entstanden.

Herstellung des Vektors pTGFG4

Der Vektor pTGFG1 wurde mit PstI verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Er wurde dann mit dem PRE(ds)-Fragment ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG4 genannt (Abb. 2).

Herstellung des Vektors pTGFG5

Der Vektor pTGFG1 wurde mit EcoO109I verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Er wurde anschließend mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG5 genannt (Abb. 3).

Herstellung des Vektors pTGFG6

Der Vektor pTGFG1 wurde mittels EheI verdaut und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Dann wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG6 genannt (Abb. 4).

Herstellung des Vektors pTGFG7

Der Vektor pTGFG1 wurde mittels KpnI verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG7 genannt (Abb. 5).

5

Herstellung des Vektors pTGFG8

Der Vektor pTGFG7 wurde mittels EheI verdaut und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG8 genannt (Abb. 6).

10

Herstellung des Vektors pTGFG9

Der Vektor pTGFG7 wurde mittels SapI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG9 genannt (Abb. 7).

15

Herstellung des Vektors pTGFG10

Der Vektor pTGFG7 wurde mittels EcoO109I verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Fragment ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG10 genannt (Abb. 8).

20

Herstellung des Vektors pTGFG11

Der Vektor pTGFG7 wurde mittels PstI verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG11 genannt (Abb. 9).

25

Herstellung des Vektors pTGFG13

Der Vektor pTGFG6 wurde mittels EcoO109I verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG13 genannt (Abb. 10).

30

Herstellung des Vektors pTGFG14

Der Vektor pTGFG6 wurde mittels PstI verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG14 genannt (Abb. 11).

35

40

Herstellung des Vektors pTGFG15

Der Vektor pTGFG5 wurde mittels SapI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG15 genannt (Abb. 12).

45

Herstellung des Vektors pTGFG16

Der Vektor pTGFG5 wurde mittels PstI verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG16 genannt (Abb. 13).

50

Herstellung des Vektors pTGFG18

Der Vektor pTGFG9 wurde mittels EcoO109I verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG18 genannt (Abb. 14).

55

Herstellung des Vektors pTGFG19

Der Vektor pTGFG10 wurde mittels EheI verdaut und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG19 genannt (Abb. 15).

60

Herstellung des Vektors pTGFG20

Der Vektor pTGFG11 wurde mittels EcoO109I verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG20 genannt (Abb. 16).

65

genannt (Abb. 16).

Herstellung des Vektors pTGFG21

- 5 Der Vektor pTGFG15 wurde mittels *EheI* verdaut und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRB(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG21 genannt (Abb. 17).

Herstellung des Vektors pTGFG22

- 10 Der Vektor pTGFG14 wurde mittels *EcoO109I* verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG22 genannt (Abb. 18).

Herstellung des Vektors pTGFG23

- 15 Der Vektor pTGFG11 wurde mittels *EheI* verdaut und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG23 genannt (Abb. 19).

Herstellung des Vektors pTGFG24

- 20 Der Vektor pTGFG9 wurde mittels *PstI* verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG24 genannt (Abb. 20).

Herstellung des Vektors pTGFG25

- 25 Der Vektor pTGFG14 wurde mittels *SapI* verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG25 genannt (Abb. 21).

Herstellung des Vektors pTGFG26

- 30 Der Vektor pTGFG16 wurde mittels *SapI* verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG26 genannt (Abb. 22).

Herstellung des Vektors pTGFG27

- 40 Der Vektor pTGFG9 wurde mittels *EheI* verdaut und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG27 genannt (Abb. 23).

Herstellung des Vektors pTGFG28

- 45 Der Vektor pTGFG18 wurde mittels *EheI* verdaut und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG28 genannt (Abb. 24).

Herstellung des Vektors pTGFG29

- 50 Der Vektor pTGFG25 wurde mittels *EcoO109I* verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG29 genannt (Abb. 25).

Herstellung des Vektors pTGFG30

- 55 Der Vektor pTGFG27 wurde mittels *PstI* verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Fragment ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG30 genannt (Abb. 26).

Herstellung des Vektors pTGFG31

- 60 Der Vektor pTGFG24 wurde mittels *EcoO109I* verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG31 genannt (Abb. 27).

Herstellung des Vektors pTGFG32

- 65 Der Vektor pTGFG19 wurde mittels *PstI* verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG32 genannt

(Abb. 28).

Herstellung des Vektors pTGFG33

Der Vektor pTGFG28 wurde mittels PstI verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRI(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG33 genannt (Abb. 29).

Herstellung des Vektors pTGFG2

Der Vektor pUC19 (MBI Fermentas) wurde mit SalI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Er wurde mit dem NotI-Linker GCGGCCGC (Biolabs # 1045) ligiert, der entstehende Vektor wurde pUC19/N genannt.

Ein 1,4 kb Fragment, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt und von einer menschlichen cDNA-Bank isoliert worden war, wurde in die PstI-Schnittstelle des Vektors pUC19/N eingefügt, der mit PstI verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert worden war. Aus dem resultierenden Vektor pUC19/N-FIX wurde ein 1,4 kb Fragment, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt, mit Hilfe eines Doppelverdaus mit HindIII und NotI herausgeschnitten. Dieses Fragment wurde mit dem 4,3 kb Fragment des HindIII/NotI-doppelverdauten Vektors pTGFG1 ligiert. Der entstehende Vektor wurde pTGFG2 genannt (Abb. 30).

Herstellung des Vektors pTGFG34

Aus dem Vektor pUC19/N-FIX wurde mittels eines HindIII/NotI-Doppelverdaus ein 1,4 kb Fragment ausgeschnitten, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt. Dieses Fragment wurde mit dem 4,3 kb Fragment des HindIII/NotI-doppelverdauten Vektors pTGFG3 ligiert. Der entstehende Vektor wurde pTGFG34 genannt (Abb. 31).

Herstellung des Vektors pTGFG35

Aus dem Vektor pUC19/N-FIX wurde durch HindIII/NotI-Doppelverdaus ein 1,4 kb Fragment ausgeschnitten, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt. Dieses Fragment wurde mit dem 4,3 kb Fragment des HindIII/NotI-doppelverdauten Vektors pTGFG4 ligiert. Der entstehende Vektor wurde pTGFG35 genannt (Abb. 32).

Herstellung des Vektors pTGFG36

Aus dem Vektor pUC19/N-FIX wurde durch HindIII/NotI-Doppelverdauung ein 1,4 kb Fragment ausgeschnitten, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt. Dieses Fragment wurde mit dem 4,3 kb Fragment des HindIII/NotI-doppelverdauten Vektors pTGFG5 ligiert. Der entstehende Vektor wurde pTGFG36 genannt (Abb. 33). Dieser Vektor wird für die Einführung von Faktor IX in die Zelle bevorzugt. Seine DNA-Sequenz ist in Abb. 46 dargestellt.

Herstellung des Vektors pTGFG37

Aus dem Vektor pUC19/N-FIX wurde durch HindIII/NotI-Doppelverdaus ein 1,4 kb Fragment ausgeschnitten, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt. Dieses Fragment wurde mit dem 4,3 kb Fragment des HindIII/NotI-doppelverdauten Vektors Vektors pTGFG6 ligiert. Der entstehende Vektor wurde pTGFG37 genannt (Abb. 35).

Herstellung des Vektors pTGFG38

Aus dem Vektor pUC19/N-FIX wurde durch HindIII/NotI-Doppelverdaus ein 1,4 kb Fragment ausgeschnitten, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt. Dieses Fragment wurde mit dem 4,3 kb Fragment des HindIII/NotI-doppelverdauten Vektors pTGFG7 ligiert. Der entstehende Vektor wurde pTGFG38 genannt (Abb. 35).

Herstellung des Vektors pTGFG53

Aus dem Vektor pUC19/N-FIX wurde durch HindIII/NotI-Doppelverdaus ein 1,4 kb Fragment ausgeschnitten, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt. Dieses Fragment wurde mit dem 4,3 kb Fragment des HindIII/NotI-doppelverdauten Vektors pTGFG20 ligiert. Der entstehende Vektor wurde pTGFG53 genannt (Abb. 36).

Herstellung des Vektors pTGFG64

Aus dem Vektor pUC19/N-FIX wurde durch HindIII/NotI-Doppelverdauung ein 1,4 kb Fragment ausgeschnitten, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt. Dieses Fragment wurde mit dem

4,3 kb Fragment des HindIII/NotI-doppelverdauten Vektors pTGF633 ligiert. Der entstehende Vektor wurde pTGF64 genannt (Abb. 37).

Herstellung des Inserts ALLG(ds)

Die Oligonukleotide (Metablon) ALLG1/1 (5'-AGC TTG ACC TCG AGC AAG C-3') (SEQ. ID NO: 6) und ALLG2 (5'-GGC CGC TTG CTC GAG GTC A-3') (SEQ. ID NO: 7) wurden hybridisiert und mittels Kinasereaktion phosphoryliert, das entstehende Insert wurde ALLG(ds) genannt. Dieses Insert ALLG(ds) wurde zu dem Zwecke konstruiert, in einem beliebigen Vektor eine Sequenz mit einem multiplen Klonierungsbereich für die mögliche Einfügung anderer Transgene einzuführen.

Herstellung des Vektors pTGF60

Der Vektor pTGF61 wurde mit HindIII und NotI doppelverdaut. Das 4,3 kb Fragment wurde mit dem Insert ALLG(ds) ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGF60 genannt (Abb. 38).

Herstellung des Vektors pTGF66

Der Vektor pTGF64 wurde mit HindIII und NotI doppelverdaut. Das 4,3 kb Fragment wurde mit dem Fragment ALLG(ds) ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGF66 genannt (Abb. 39).

Herstellung des Vektors pTGF67

Der Vektor pTGF65 wurde mit HindIII und NotI doppelverdaut. Das 4,3 kb Fragment wurde mit dem Insert ALLG(ds) ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGF67 genannt (Abb. 40). Dieser Vektor ist für die Verabreichung an jedes Genes, welches in die Klonierungsstelle eingefügt ist, bevorzugt; seine DNA-Sequenz ist in Abb. 47 dargestellt.

Herstellung des Vektors pTGF68

Der Vektor pTGF66 wurde mit HindIII und NotI doppelverdaut. Das 4,3 kb Fragment wurde mit dem Insert ALLG(ds) ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGF68 genannt (Abb. 41).

Herstellung des Vektors pTGF69

Der Vektor pTGF67 wurde mit HindIII und NotI doppelverdaut. Das 4,3 kb Fragment wurde mit dem Insert ALLG(ds) ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGF69 genannt (Abb. 42).

Herstellung des Vektors pTGF82

Der Vektor pTGF60 wurde mit HindIII und NotI doppelverdaut. Das 4,3 kb Fragment wurde mit dem Insert ALLG(ds) ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGF82 genannt (Abb. 43).

Herstellung des Vektors pTGF95

Der Vektor pTGF633 wurde mit HindIII und NotI doppelverdaut. Das 4,3 kb Fragment wurde mit dem Fragment ALLG(ds) ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGF95 genannt (Abb. 44).

Beispiel II

Isolierung von humaner Faktor IX cDNA

Faktor IX cDNA wurde unter Verwendung zweier Primer, die mit dem Start bzw. Stop-Kodon des Faktor IX Leserahmens überlappten, aus menschlicher Leber-cDNA (Clontech) amplifiziert. Das entstehende 1387 Basenpaarfragment enthielt den vollständigen offenen Leserahmen. Schnittstellen für EcoRI (upstream) und BamHI (downstream) wurden an das Ende des jeweiligen Primers gesetzt, um die Klonierung zu erleichtern. Die Amplifizierung erfolgte mit Pwo Polymerase (Boehringer Mannheim) in einem 50 µl Reaktionsvolumen [10 mM Tris HCl pH 8,85, 25 mM KCl, 5 mM Ammoniumsulfat, 2 mM Magnesiumsulfat] mit 30 Inkubationszyklen (1 min. 96°C, 1 min. 60°C, 2 min. 72°C, gefolgt von einem abschließenden Verlängerungsschritt von 10 min bei 72°C).

Die Reaktionsprodukte wurden in die EcoRI- und BamHI-Schnittstellen von pUC19 ligiert und zur Transformation von E. coli DH5-a verwendet. Positive Klone wurden selektiert. Die Richtigkeit der Sequenzen wurde durch zyklische Sequenzierung (Amersham) von beiden Enden mit markierten Primern (IR-700) und automatisierter Analyse mit Hilfe des LiCor Sequenzierungssystems (MWG, Biotech) bestätigt.

Die folgenden Primer wurden verwendet:

gGAATTCcgcaaaaggttATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGC(upstream)(SEQ. ID NO:8)

cgcGGATCCATTAAGTGAGCTTTGTTTTTTCCTTAATCC (downstream)(SEQ. ID NO:9)

Beispiel III

Expression und Quantifizierung des Markerproteins GFP ("Green Fluorescent Protein")

HeLa-Zellen wurden durch Elektroporation mit den Plasmiden pTGFG5 bzw. pTGFG20 transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden geerntet, die Zellpellets homogenisiert und in einem Puffer lysiert, der phosphatgepufferte Kochsalzlösung (pH 7,5) und 10 mM PMSF enthielt. Die Konzentration des grünen Fluoreszenzproteins (GFP) in dem Zellhomogenisat wurde durch kompetitiven ELISA bestimmt.

Zu diesem Zweck wurde GFP in einer definierten Konzentration auf Mikrotiterplatten aufgebracht. Anschließend wurden GFP-Proben in Gegenwart von anti-GFP-Antikörper hinzugefügt. Nach diversen Waschschritten wurde ein markierter zweiter Antikörper hinzugefügt, um die Detektion des ersten Antikörpers zu ermöglichen. Die Farbreaktion wurde photometrisch gemessen (Extinktion). Allgemein war umso weniger Antikörper übrig, um an das aufgebrachte GFP zu binden, je mehr GFP hinzugefügt worden war.

Demzufolge korreliert eine verminderte Extinktion mit einer höheren GFP-Konzentration in der Probe.

Durch lineare Regression wurde eine GFP-Konzentrationskurve bestimmt (Abb. 47), wobei bovines Serumalbumin (BSA) als Standard verwendet wurde. Dabei wurde ein Durchschnittswert von 2,4 µg GFP/ml im Falle von pTGFG5 (1 PRE) und 5,2 µg GFP/ml im Falle von pTGFG20 (3 PREs) gefunden.

Abb. 48a-d zeigen mikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellkulturen nach der Transfektion mit pTGFG5 (Abb. 48a und b) bzw. TGFG20 (Abb. 48c und d).

Abb. 46a und c zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen als Kontrolle, und Abb. 48b und d zeigen die entsprechenden Ausschnitte in Fluoreszenzaufnahme. Standardmäßig haben mehr als 50% der Zellen GFP exprimiert, was auf eine sehr effiziente Expression hinweist, wobei in Gegenwart eines einzigen PRE eine effizientere Expression erfolgte.

Beispiel IV

Quantifizierung von menschlichem Faktor IX mittels ELISA

HeLa-Zellen wurden entweder durch Elektroporation oder durch Verwendung des Liposonreagenzes DOTAP (Boehringer Mannheim) mit den Plasmiden pTGFG36, pTGFG53 und pTGFG64 transfiziert. Diese Plasmide enthalten die cDNA des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX. Rekombinanter menschlicher Blutgerinnungsfaktor IX wurde in den Zellkulturüberstand sezerniert und mit Hilfe einer Sandwich-ELISA-Methode quantifiziert.

0,11 M Natriumcitrat und 10 mM PMSF wurden zugegeben, um die Degradation des menschlichen Faktors IX zu verhindern. Die Konzentrationsbestimmung des exprimierten humanen Faktors IX wurde unter Verwendung des enzym-immunologischen in vitro Verfahrens "Asserachrom IX:AG" von Boehringer-Mannheim durchgeführt. Als Standard wurde der Faktor IX Standard von Octapharma AG in wässrigen Lösungen von 28 IU/ml verwendet.

In sechs verschiedenen Transfektionsexperimenten, in denen HeLa-Zellen mit Plasmiden transfiziert und die menschliche Faktor IX-cDNA (pTGFG36, 53 und 64) unter Verwendung von Elektroporation oder des Lipid-Transfektionsreagenzes (DOTAP, Boehringer Mannheim) transfiziert wurden, wurde ein Konzentrationsbereich von 3-25 ng/ml humanen Gerinnungsfaktors IX erreicht.

Patentansprüche

1. Eine Stoffzusammensetzung, die eine Nukleinsäure enthält, die ein hormonresponsives Element (HRE) umfaßt, wobei dieses hormonresponsive Element an einen Hormon-Hormonrezeptorkomplex gekoppelt ist.
2. Eine Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 1, wobei die Nukleinsäure zusätzlich ein Gen enthält, das für einen Blutgerinnungsfaktor kodiert.
3. Eine Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 2, wobei der menschliche Blutgerinnungsfaktor aus der Gruppe der Faktoren VIII, IX und von Willebrand Faktor (vWF) ausgewählt ist.
4. Eine Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 2, wobei das hormonresponsive Element ein steroidresponsives Element (SRE) ist.
5. Eine Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 4, wobei das steroidresponsive Element (SRE) ein progesteronresponsives Element (PRE) ist.
6. Eine Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 1, wobei der Komplex ein Steroid-Steroidrezeptorkomplex ist.
7. Eine Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 6, wobei der Rezeptor ein Progesteronrezeptor und das Steroid Progesteron ist.
8. Eine Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 3, wobei der menschliche Blutgerinnungsfaktor Faktor IX ist.
9. Eine Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 7, wobei der menschliche Blutgerinnungsfaktor Faktor IX ist.
10. Ein Nukleinsäurekonstrukt, das mindestens ein hormonresponsives Element (HRE) für die Regulation der Ex-

pression eines Genes, das für einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor kodiert, enthält.

11. Ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 10, wobei das hormonresponsive Element ein steroidresponsives Element (SRE) ist.

12. Ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 11, wobei das steroidresponsive Element ein progesteronresponsives Element (PRE) ist.

13. Ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 10, wobei der menschliche Blutgerinnungsfaktor aus der Gruppe der Faktoren VIII, IX und von Willebrand Faktor (vWF) ausgewählt ist.

14. Ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 10, das ferner einen gewebespezifischen Promotor enthält.

15. Ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 10, wobei das hormonresponsive Element (HRE) ein progesteronresponsives Element (PRE) und der Blutgerinnungsfaktor Faktor IX ist.

16. Ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 15, das ferner einen gewebespezifischen Promotor enthält.

17. Ein Vektor, der ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 10 enthält.

18. Ein Vektor, der ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 11 enthält.

19. Ein Vektor, der ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 12 enthält.

20. Ein Vektor, der ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 13 enthält.

21. Ein Vektor, der ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 14 enthält.

22. Ein Vektor, der ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 15 enthält.

23. Ein Vektor, der ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 16 enthält.

24. Eine Zelle, die mit einem Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 10 transfiziert ist.

25. Eine Zelle, die durch ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 10 transformiert wurde.

26. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Dosis eines Nukleinsäurekonstrukts gemäß Anspruch 10 und ein Hormon enthält.

27. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Dosis eines Nukleinsäurekonstrukts gemäß Anspruch 15 und Progesteron enthält.

28. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Dosis einer Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 1 enthält.

29. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Dosis einer Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 9 enthält.

30. Ein Verfahren zur Einführung einer Nukleinsäure, die für ein zu exprimierendes Gen kodiert, in eine Zelle, umfassend die Bereitstellung des Stoffgemisches gemäß Anspruch 1 an einen Organismus, so daß das Hormon des Gemisches die Zellmembran durch Diffusion durchquert und die an den Hormon-Hormonrezeptorkomplex gekoppelte Nukleinsäure durch die Membran und in die Zelle transportiert.

31. Ein Verfahren gemäß Anspruch 30, wobei eine Nukleinsäure, die für menschlichen Faktor IX kodiert, in die Zelle gebracht wird.

32. Ein Verfahren zur Behandlung eines Blutgerinnungsdefektes, das die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge einer Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 1 an einen Organismus umfaßt.

33. Ein Verfahren zur Behandlung von Hämophilie B, das die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge einer Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 9 an einen Organismus umfaßt.

Hierzu 58 Seite(n) Zeichnungen

Abbildung 1

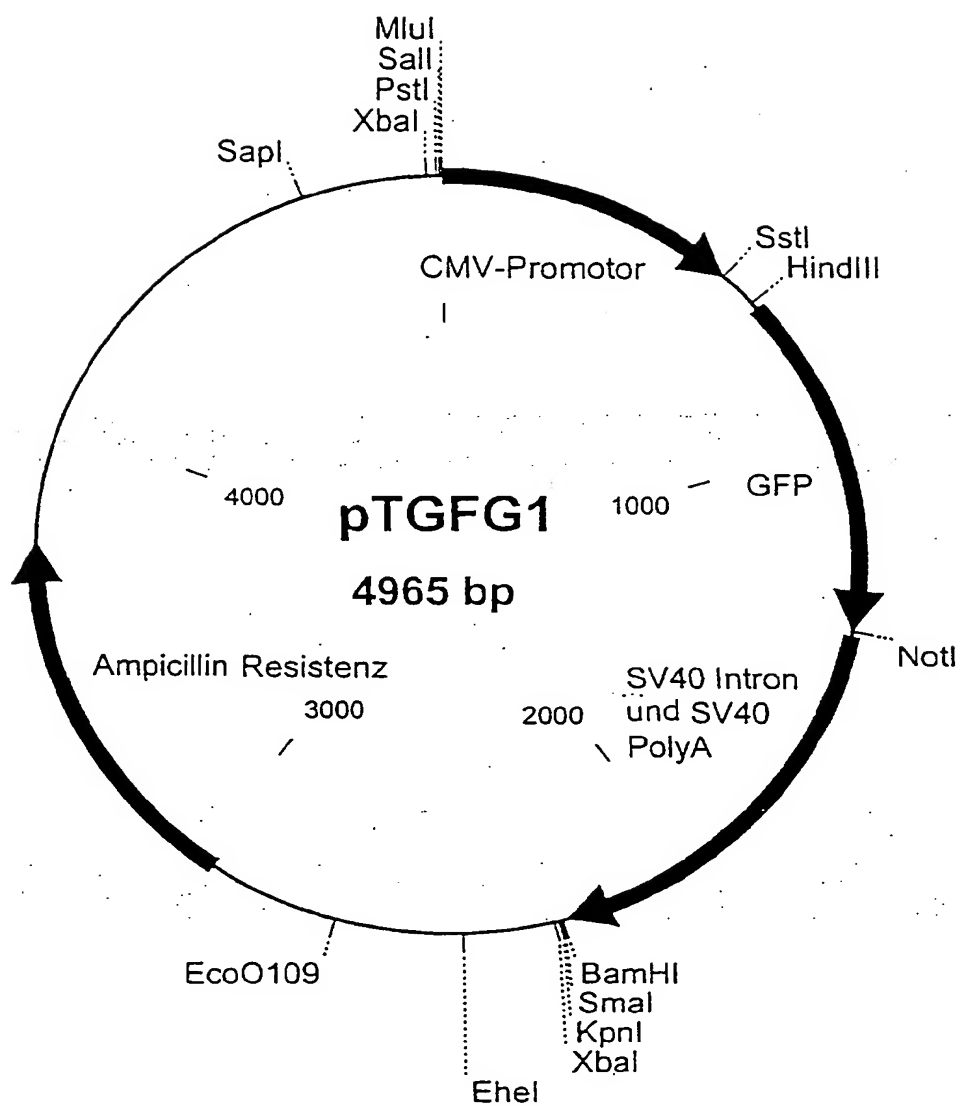


Abbildung 2

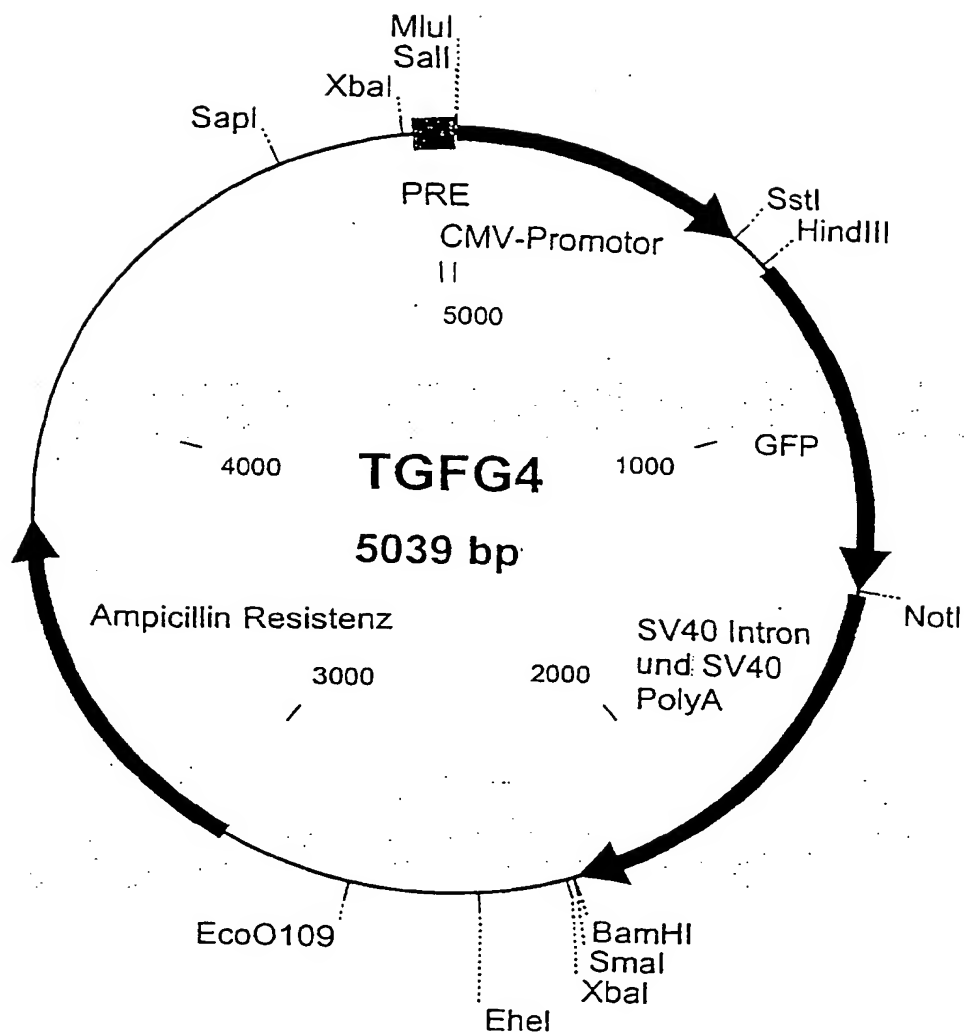


Abbildung 3

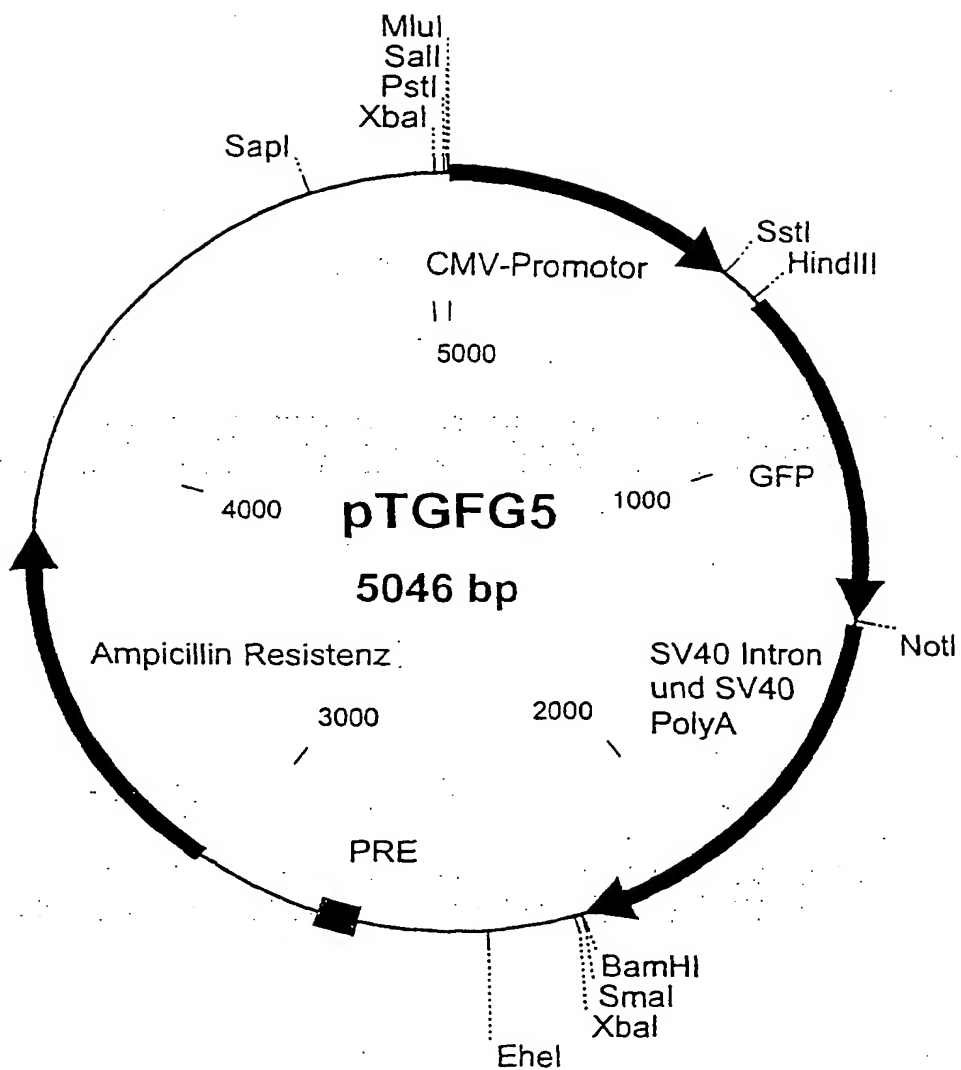


Abbildung 4

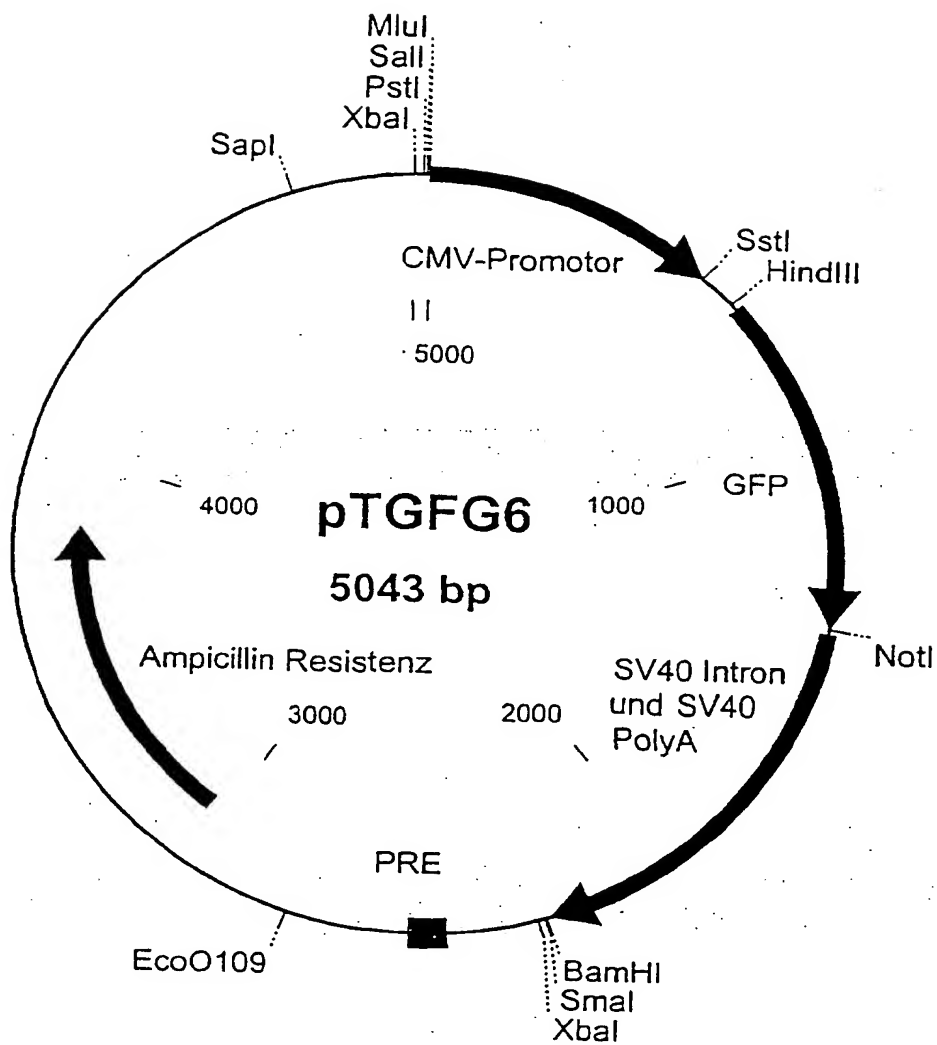


Abbildung 5

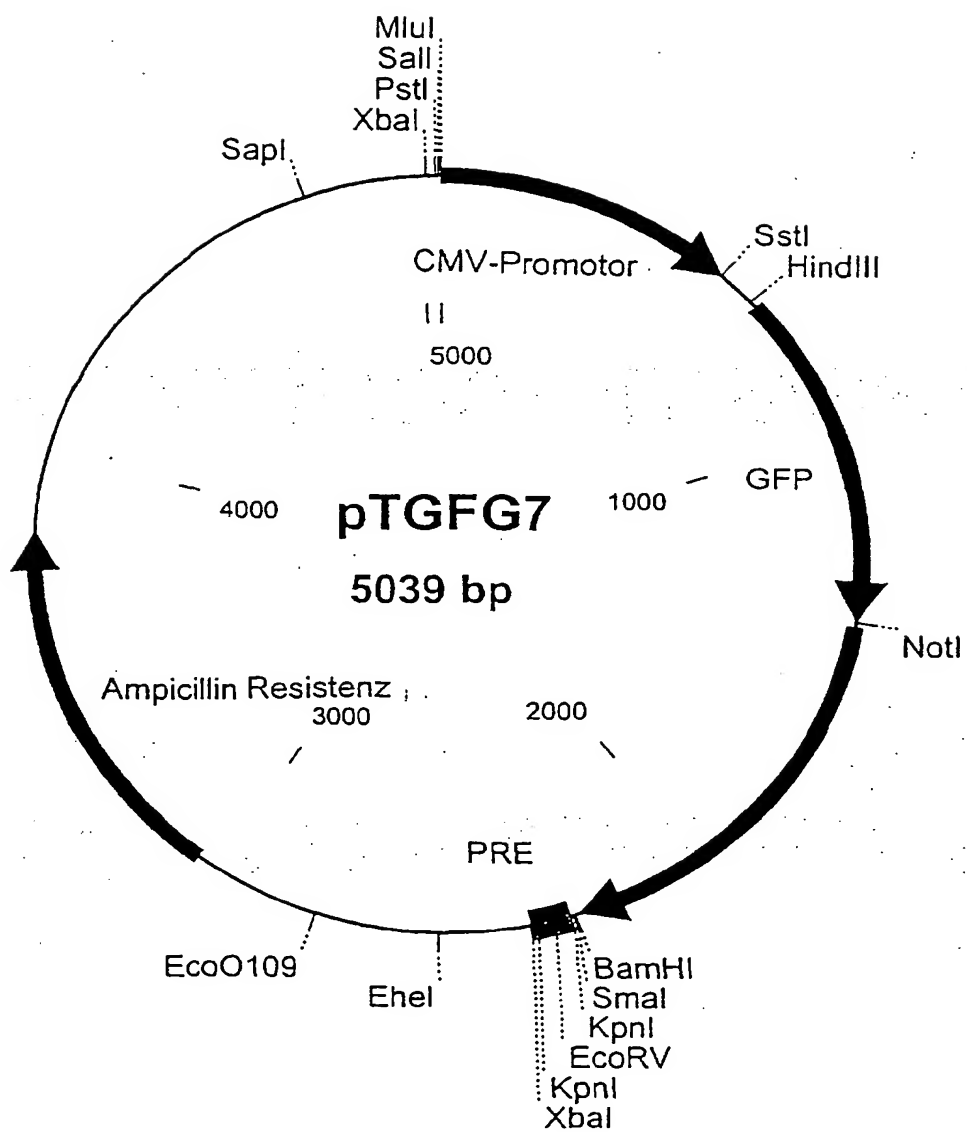


Abbildung 6

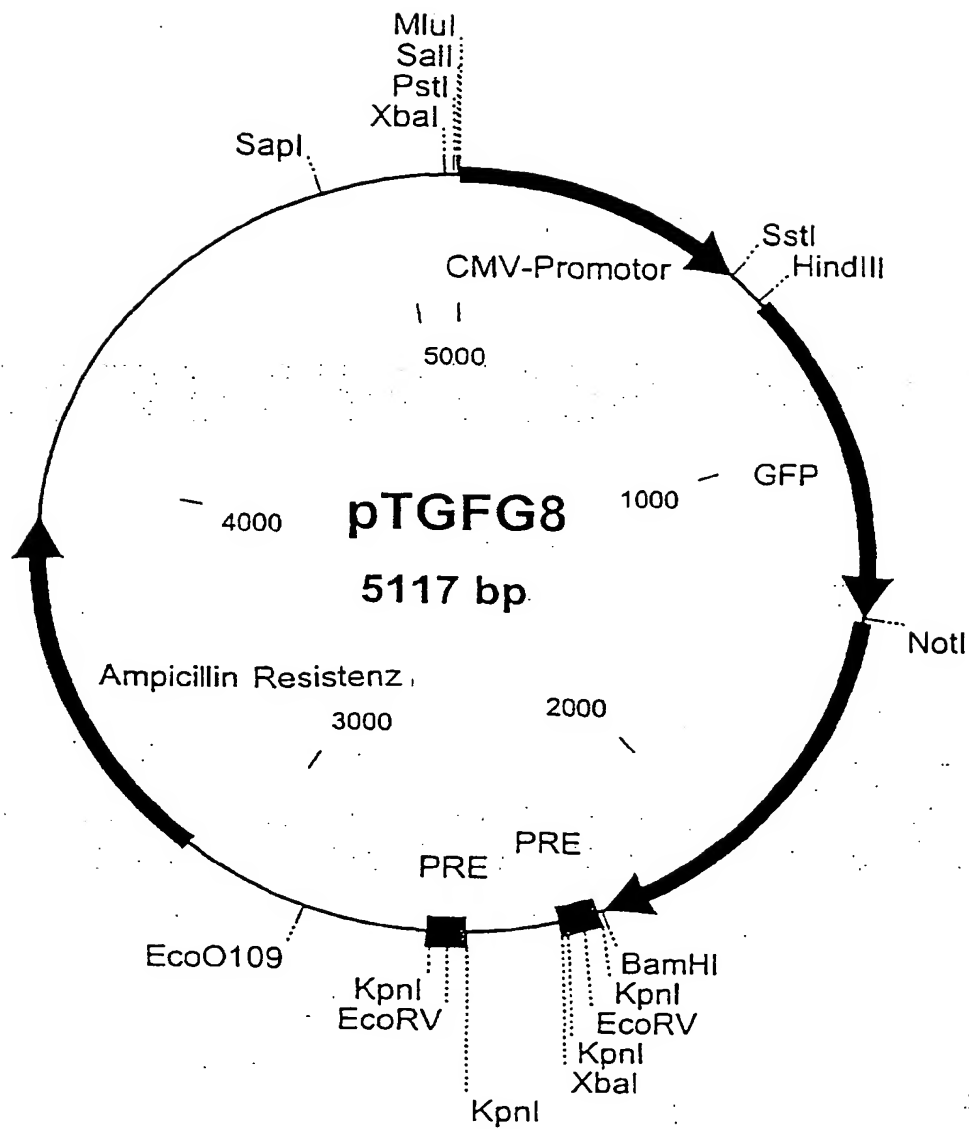


Abbildung 7

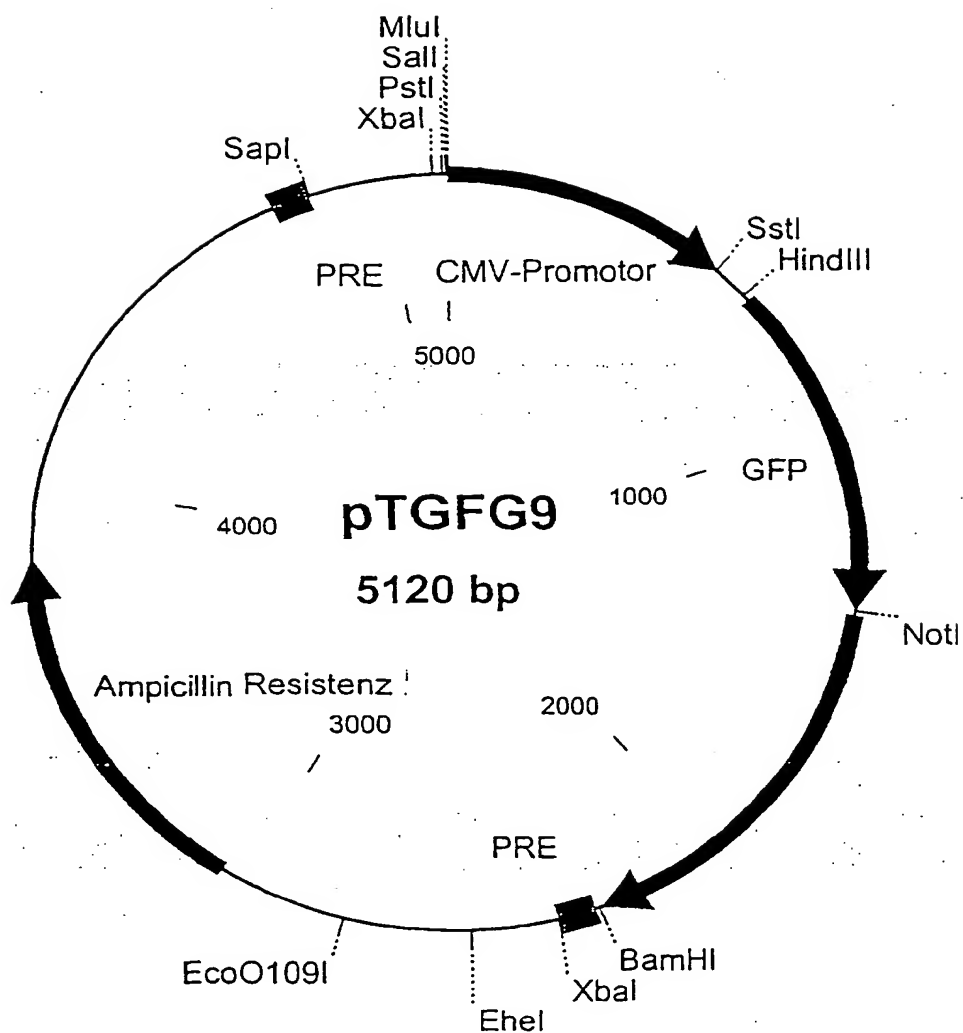


Abbildung 8

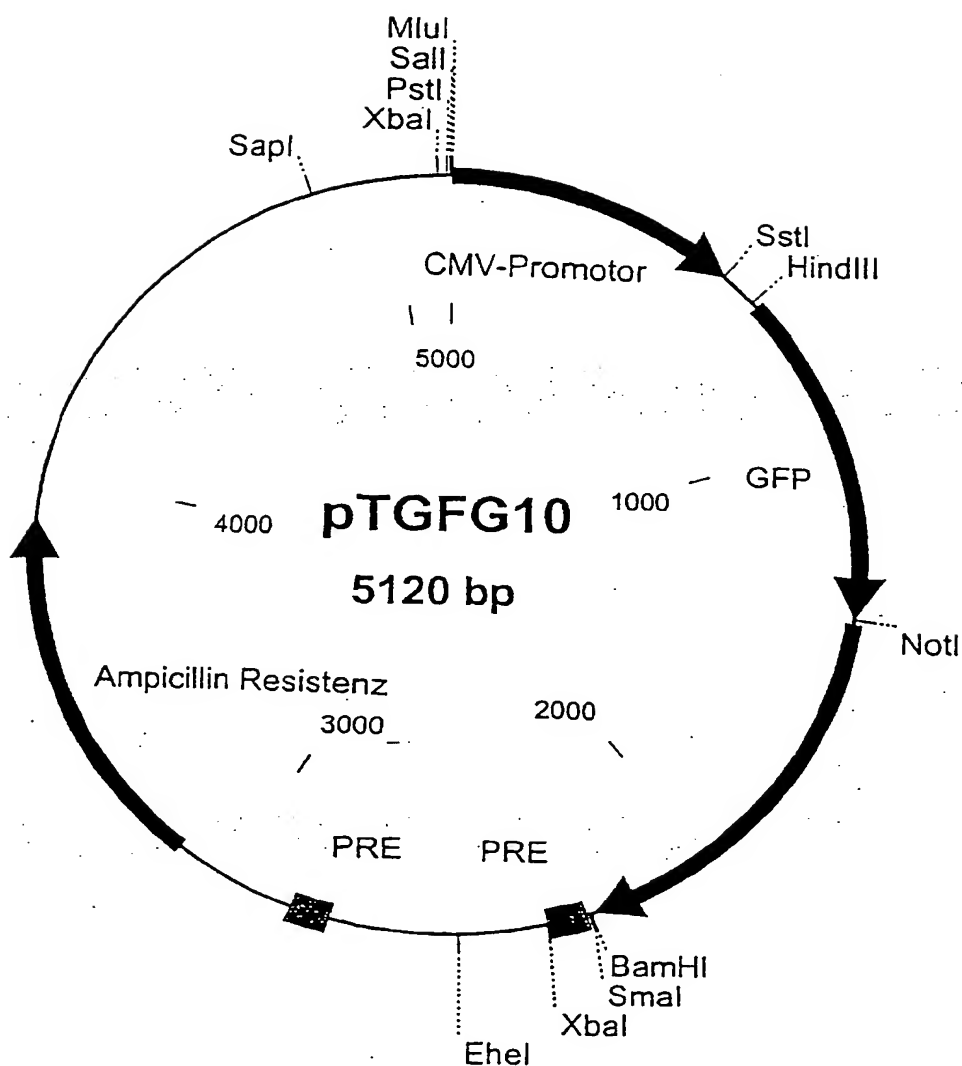


Abbildung 9

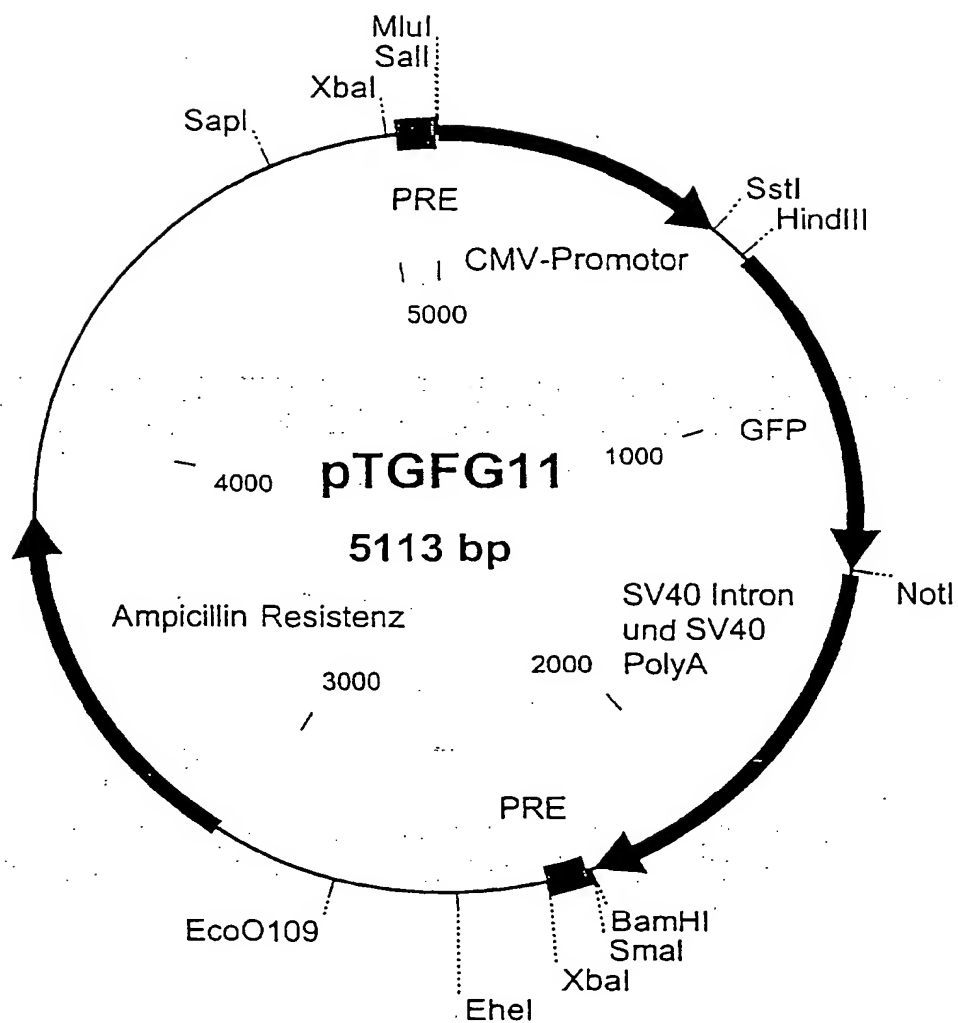


Abbildung 10

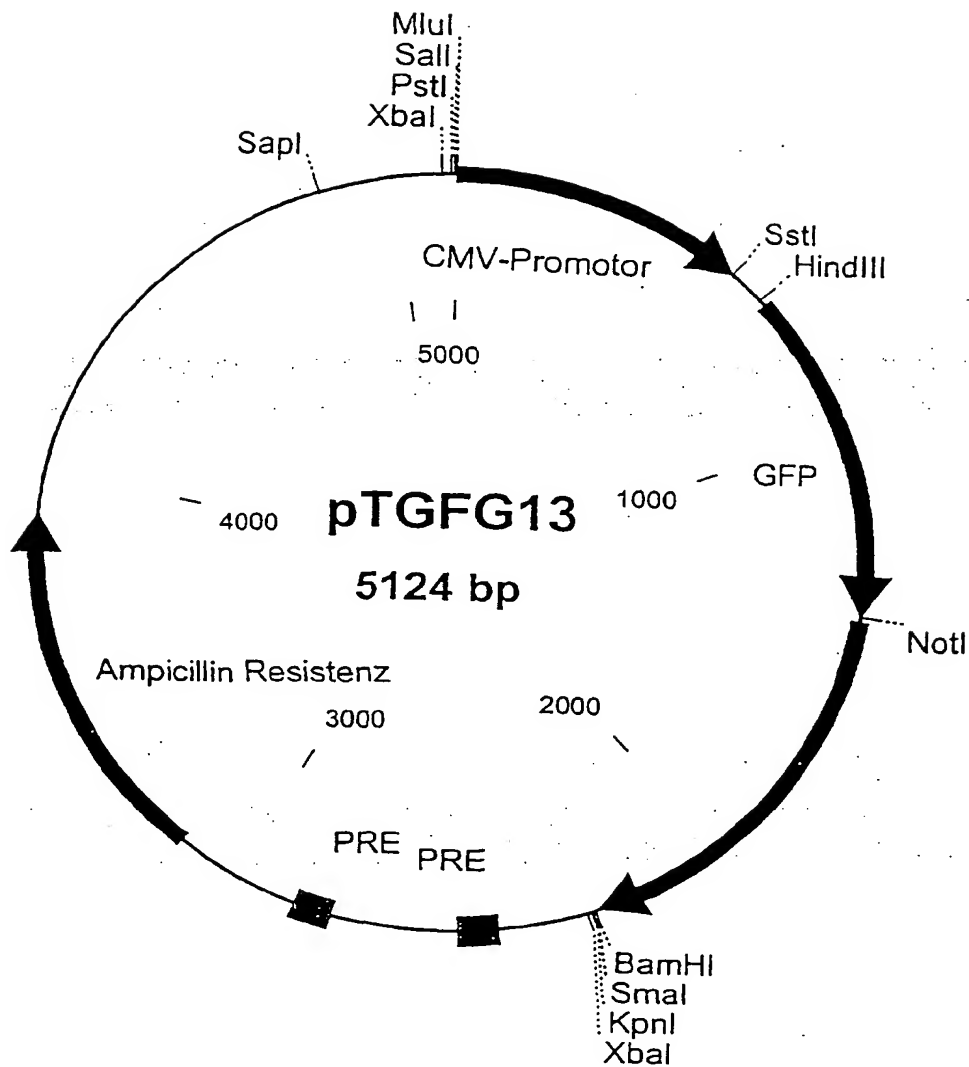


Abbildung 11

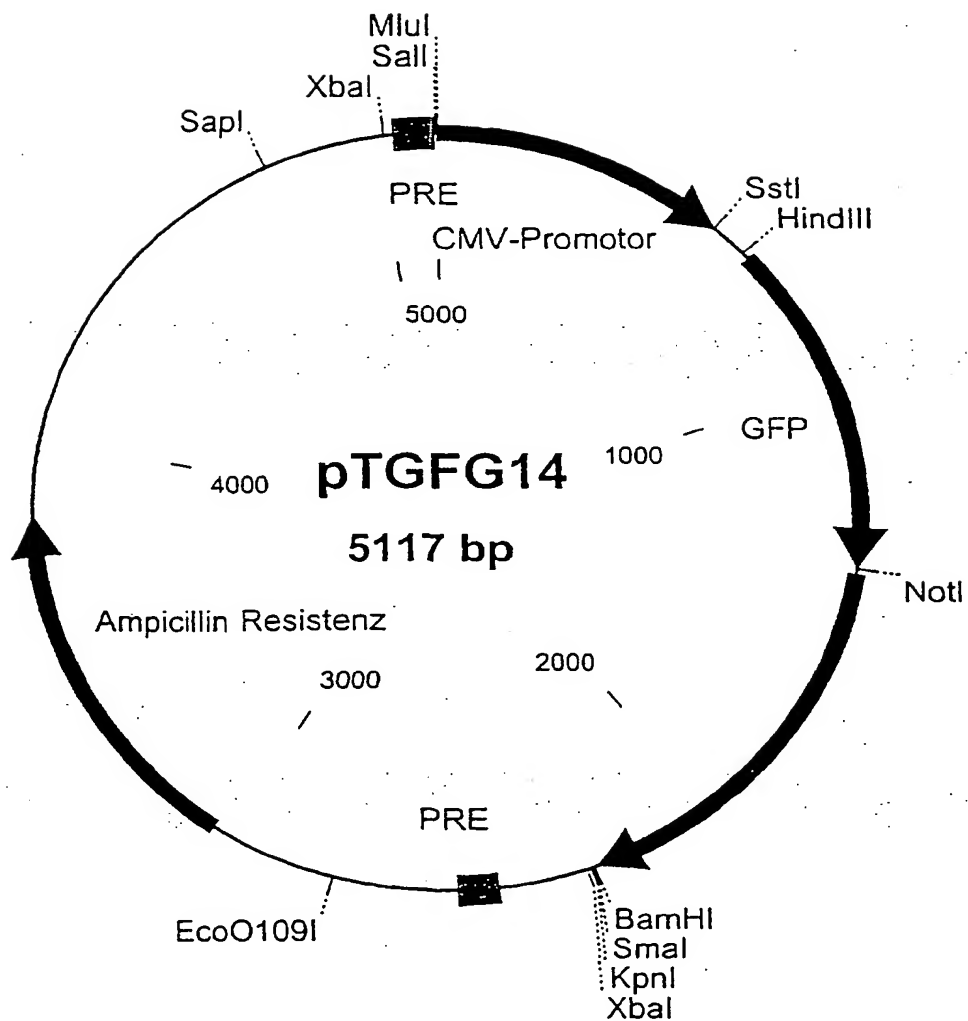


Abbildung 12

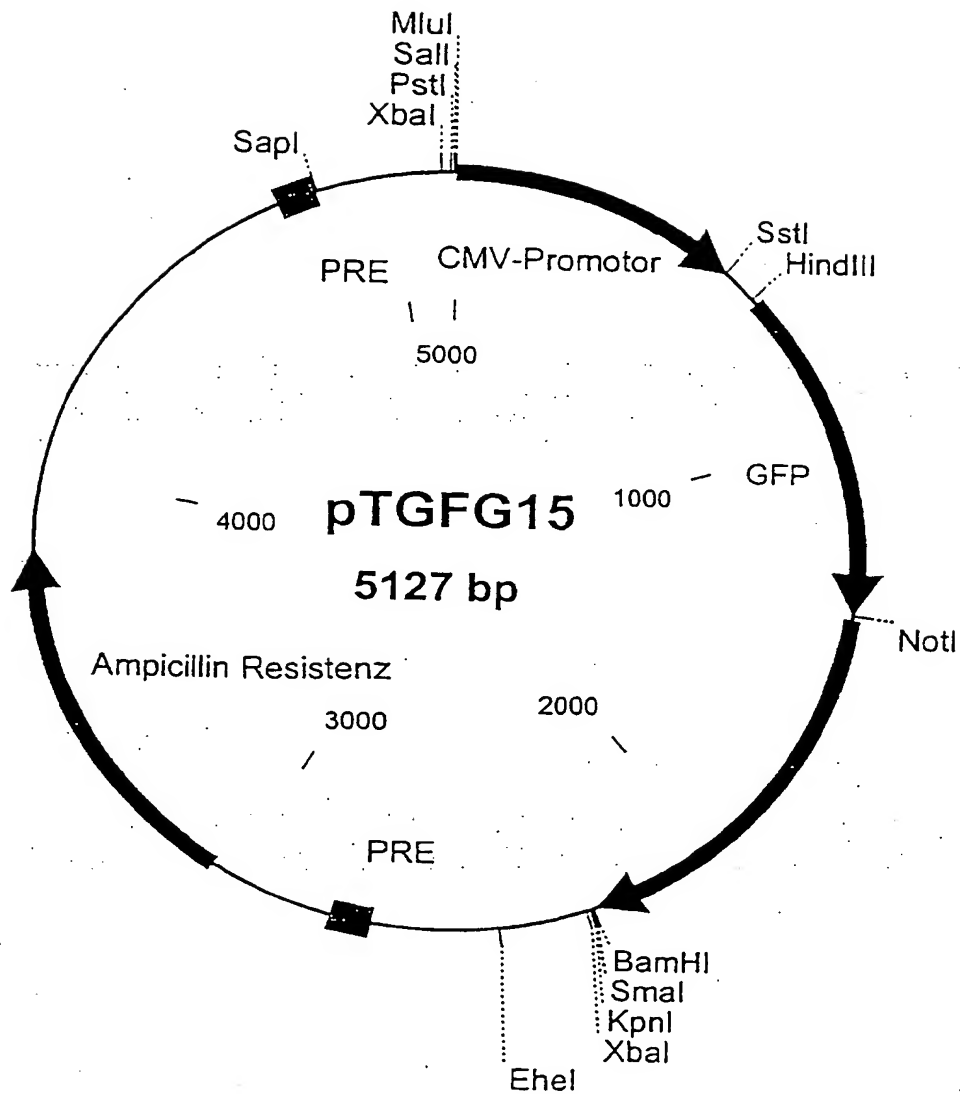


Abbildung 13

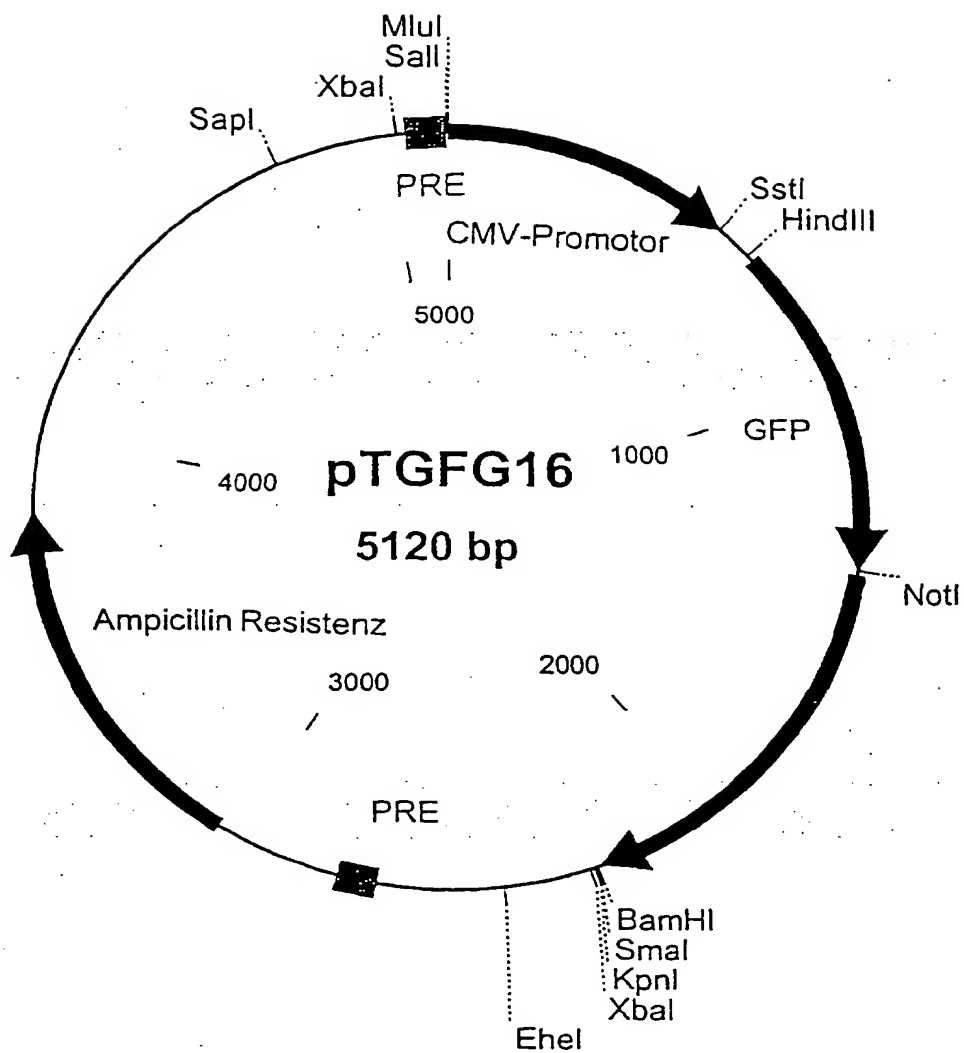


Abbildung 14

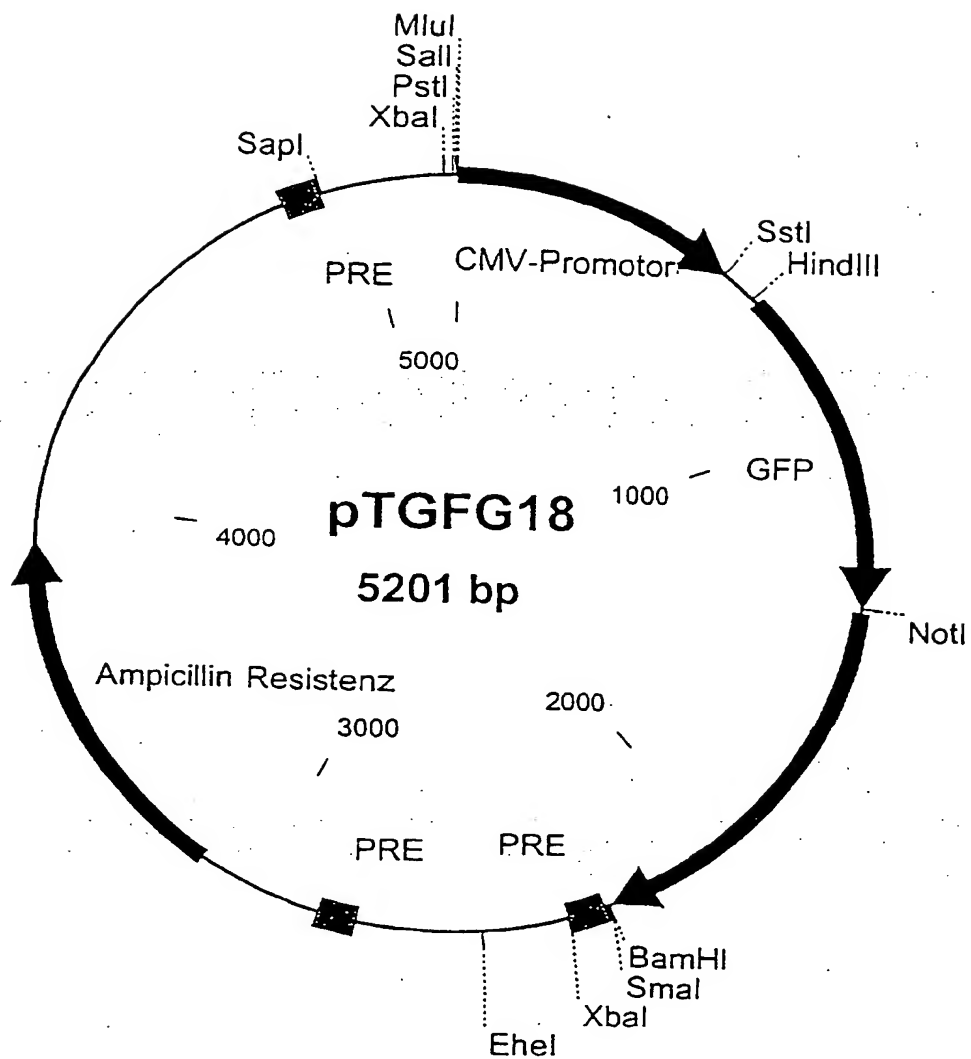


Abbildung 15

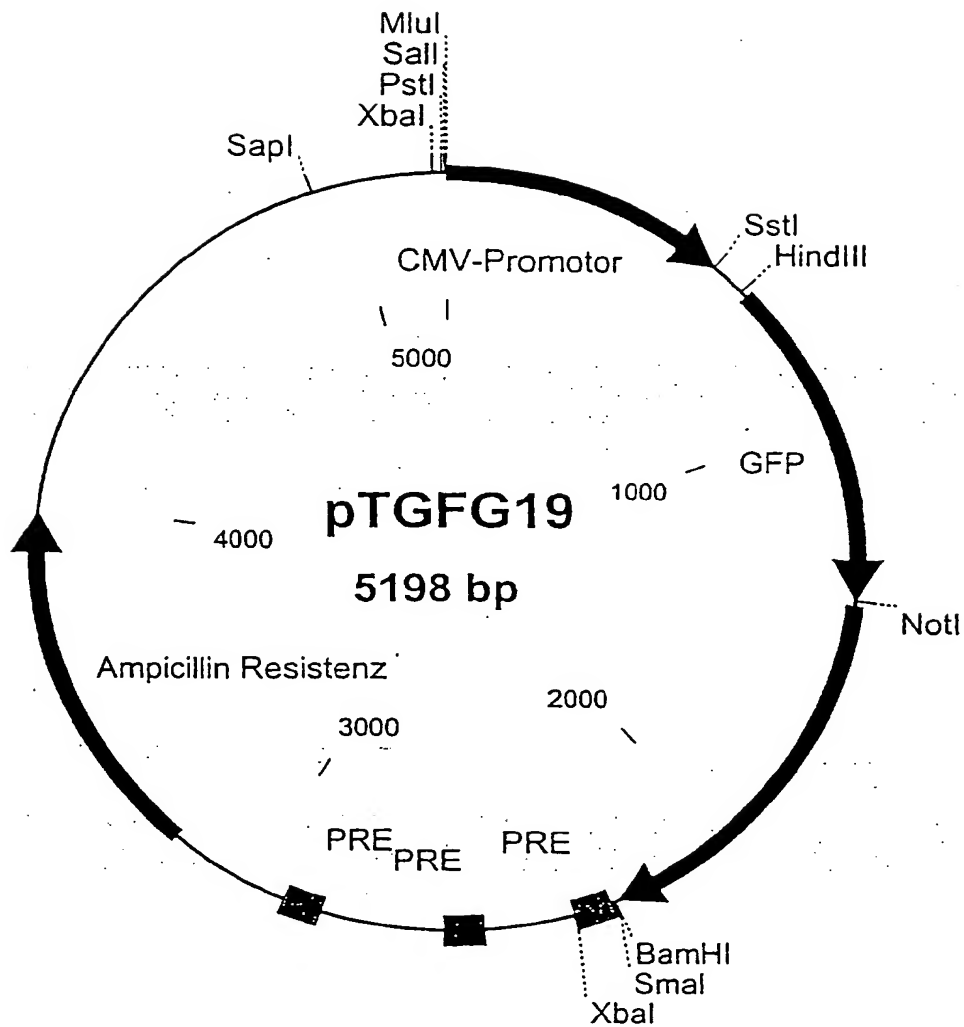


Abbildung 16

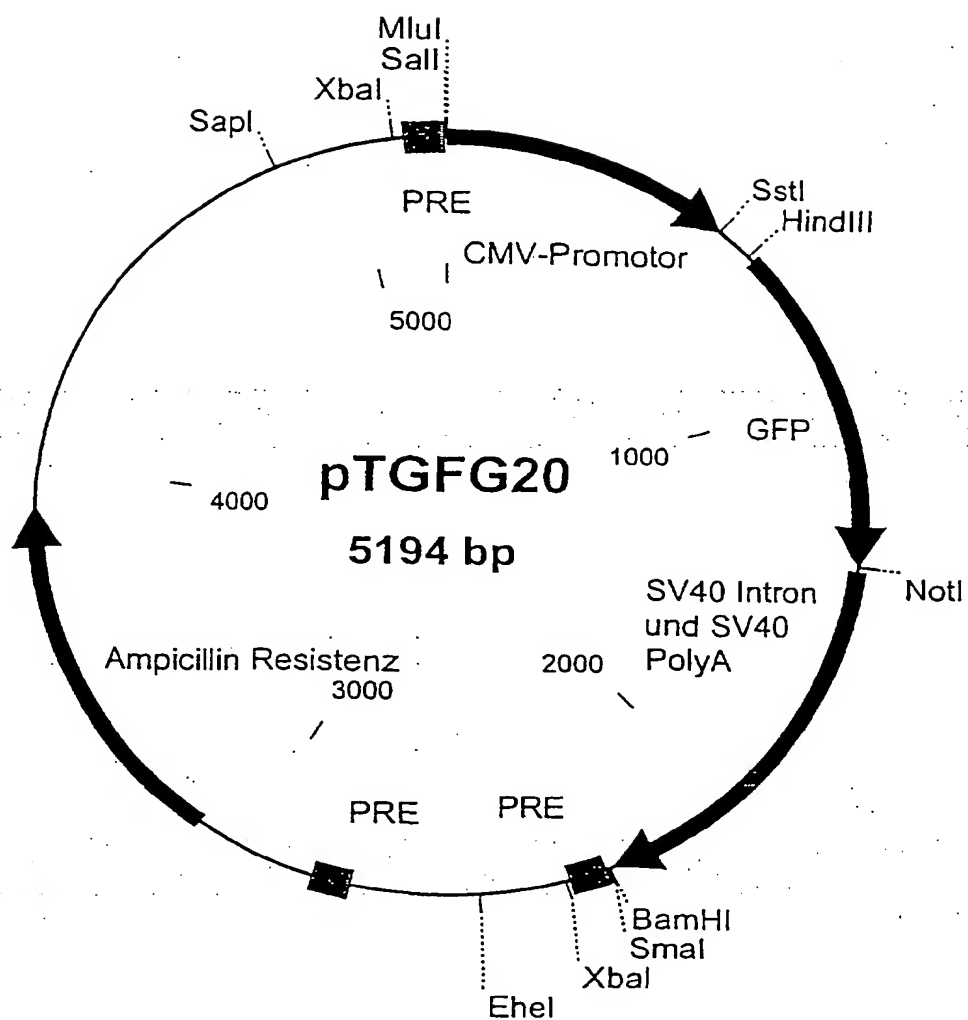


Abbildung 17

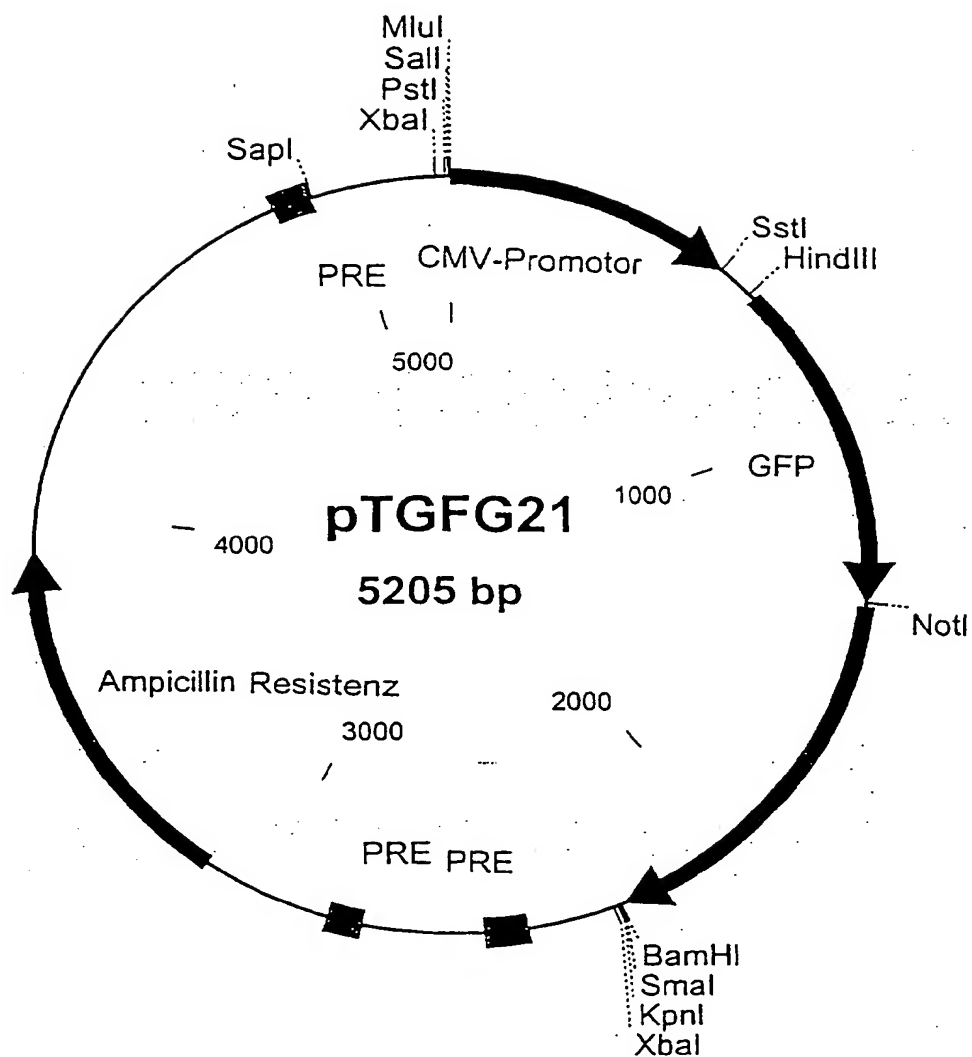


Abbildung 18

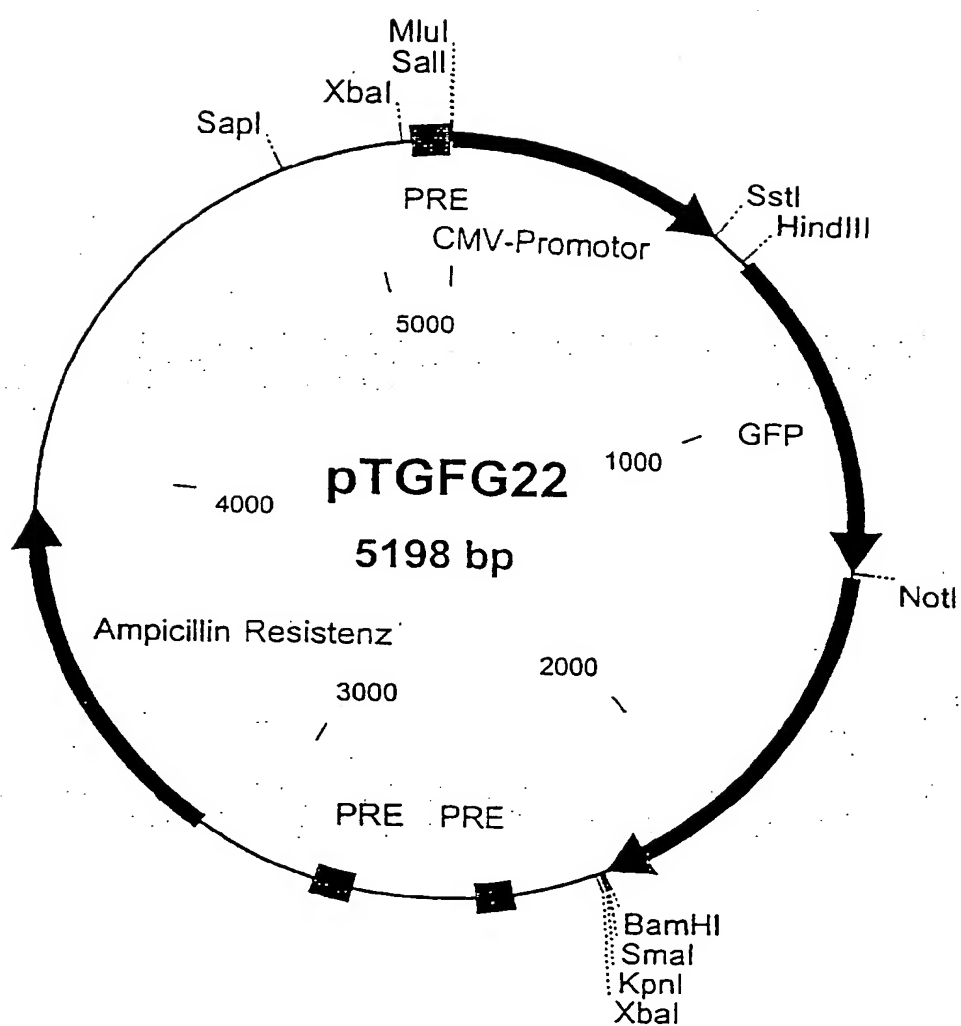


Abbildung 19

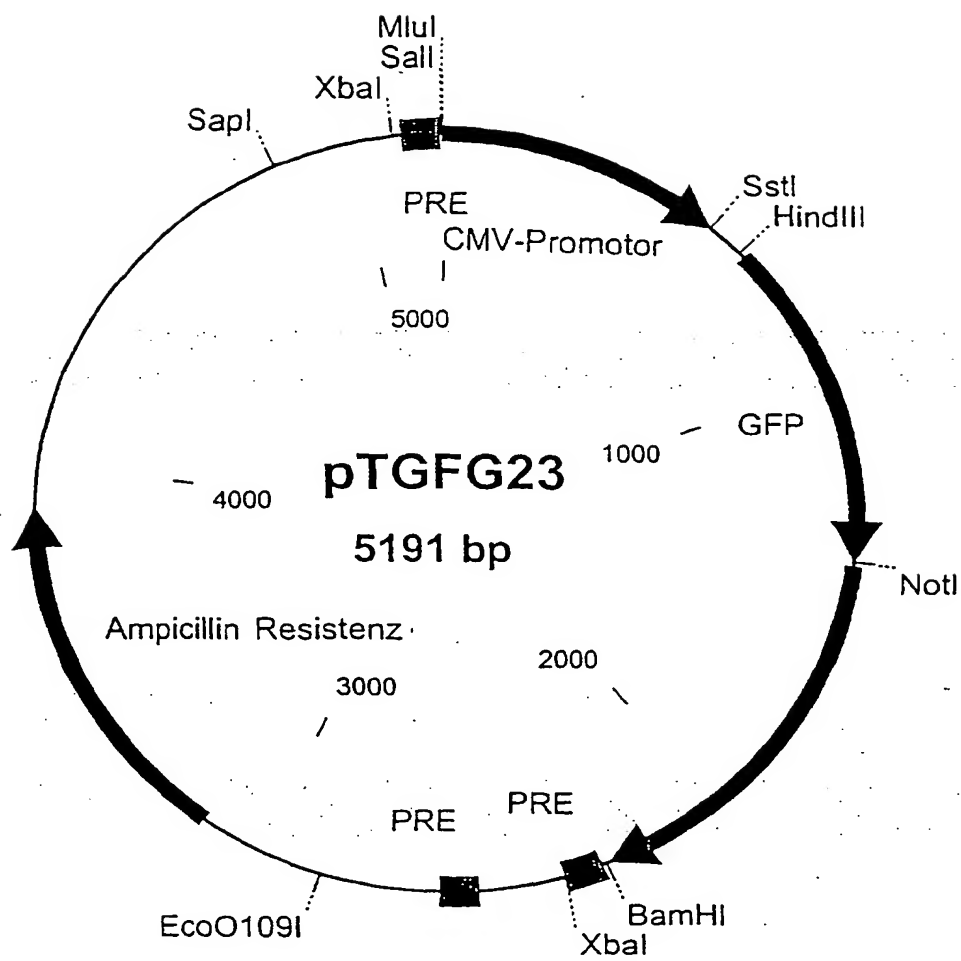


Abbildung 20

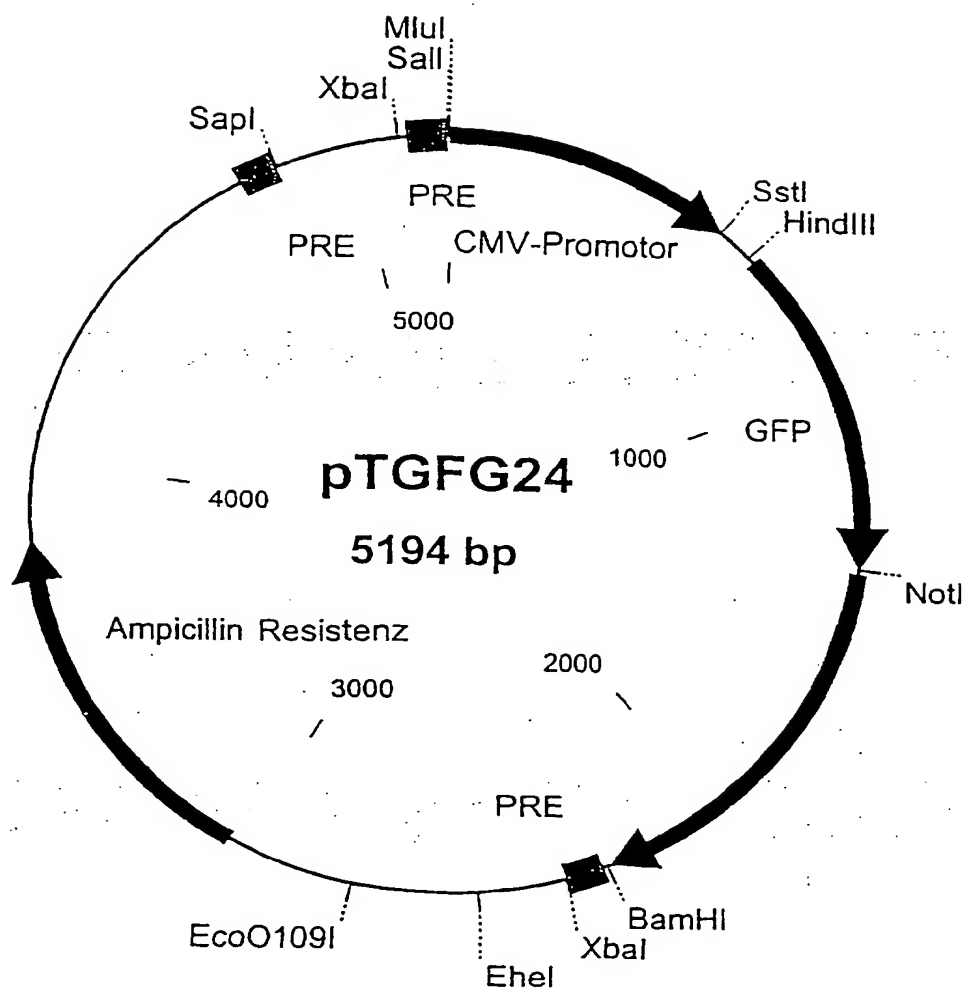


Abbildung 21

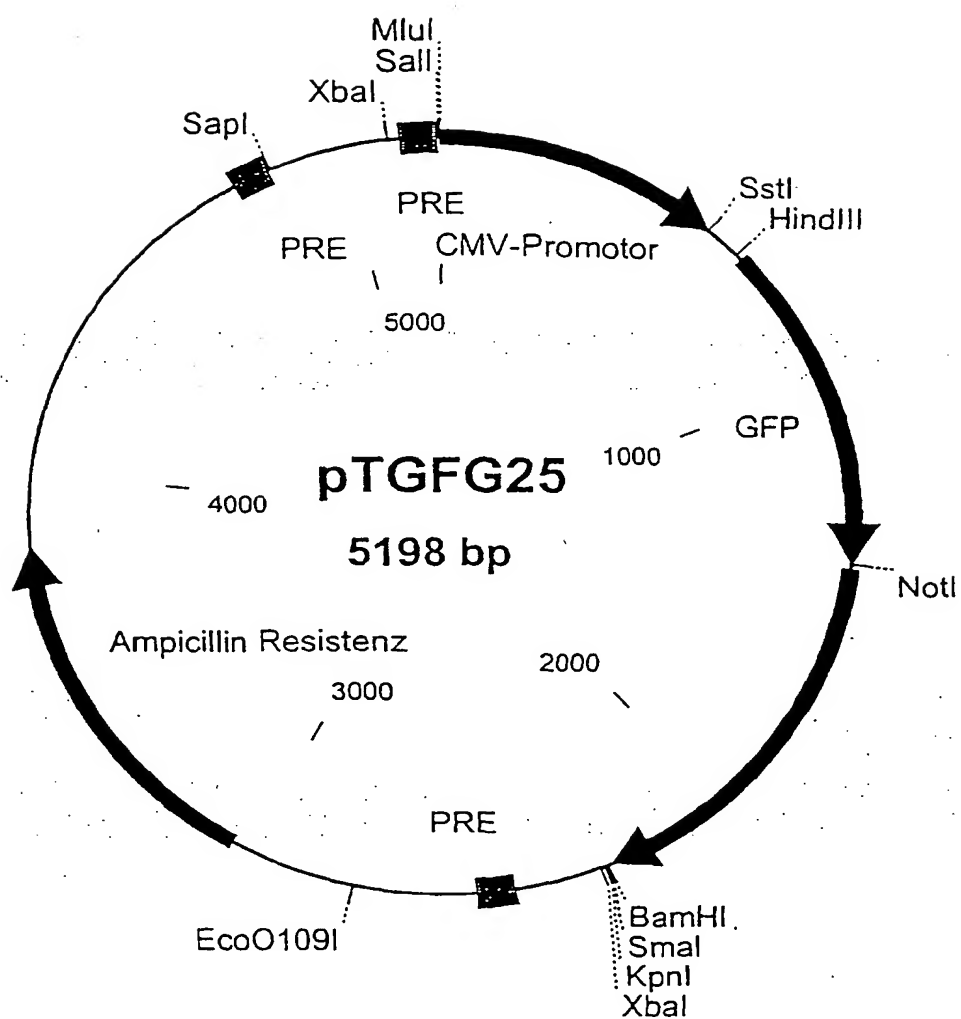


Abbildung 22

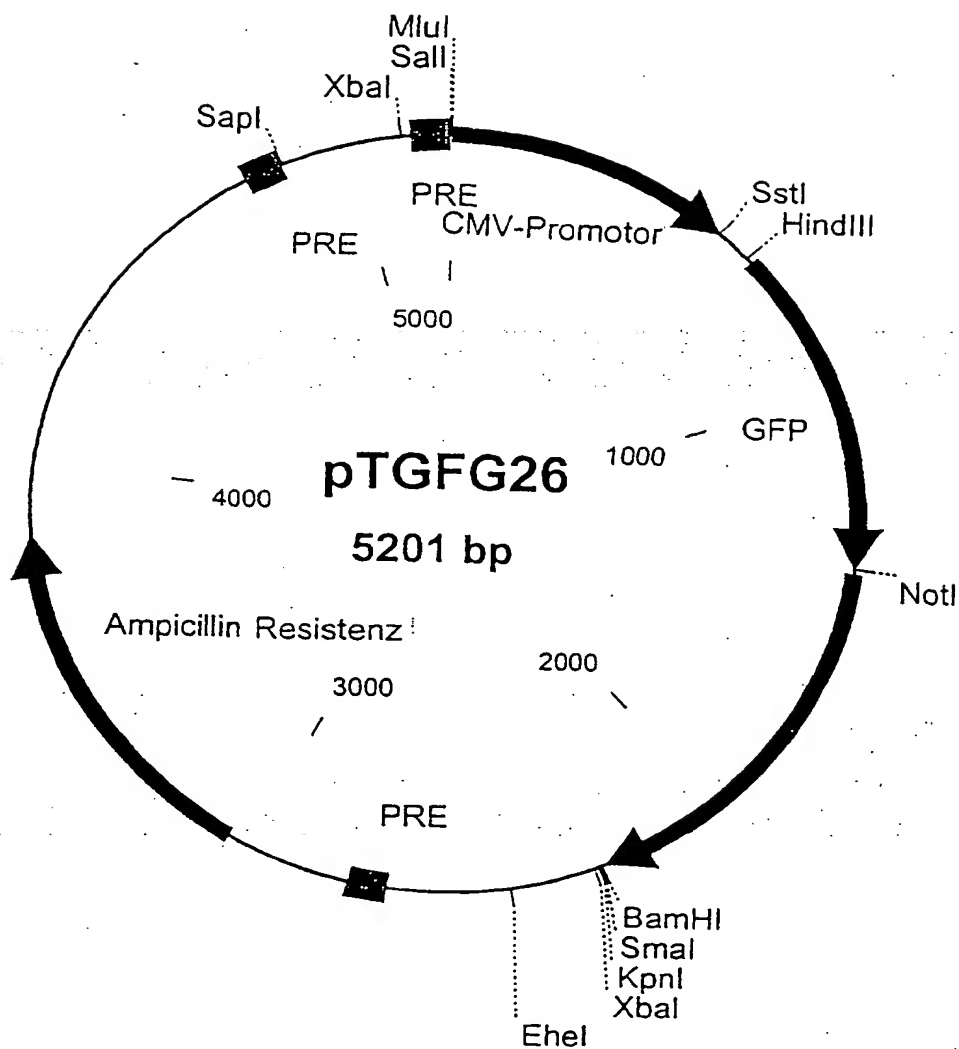


Abbildung 23

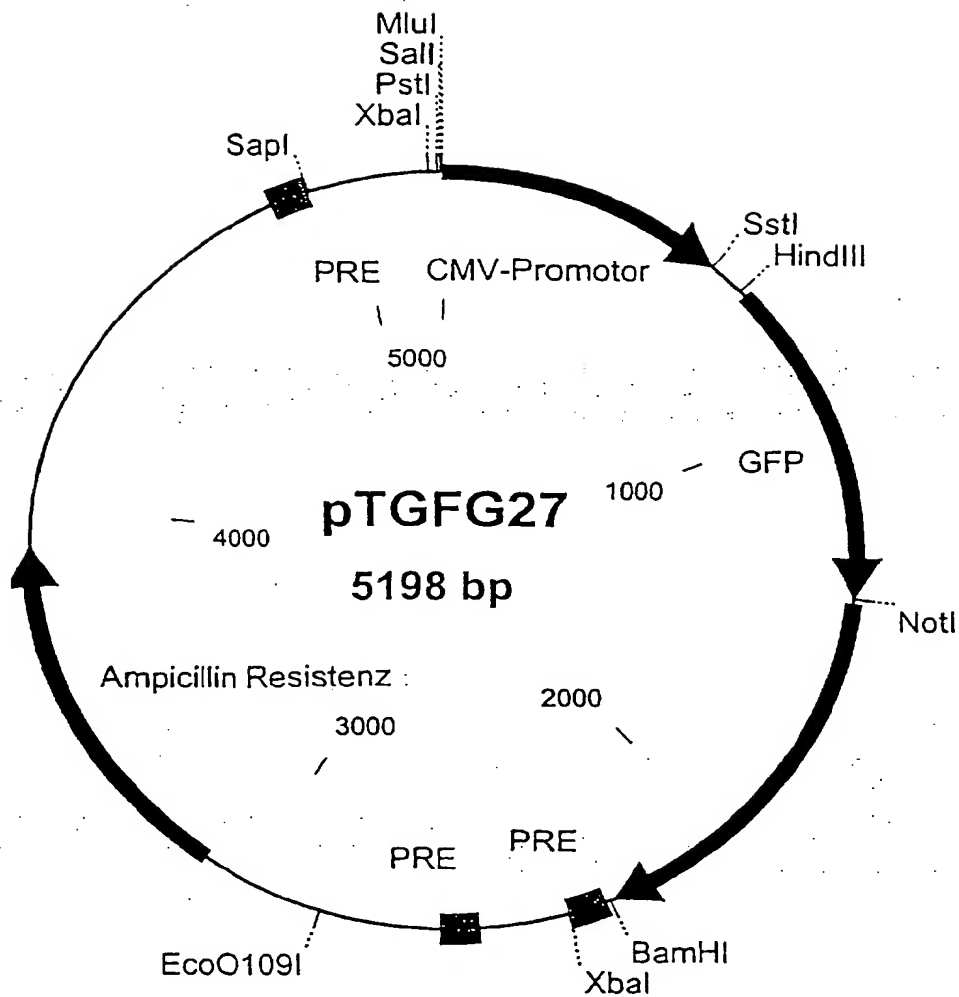


Abbildung 24

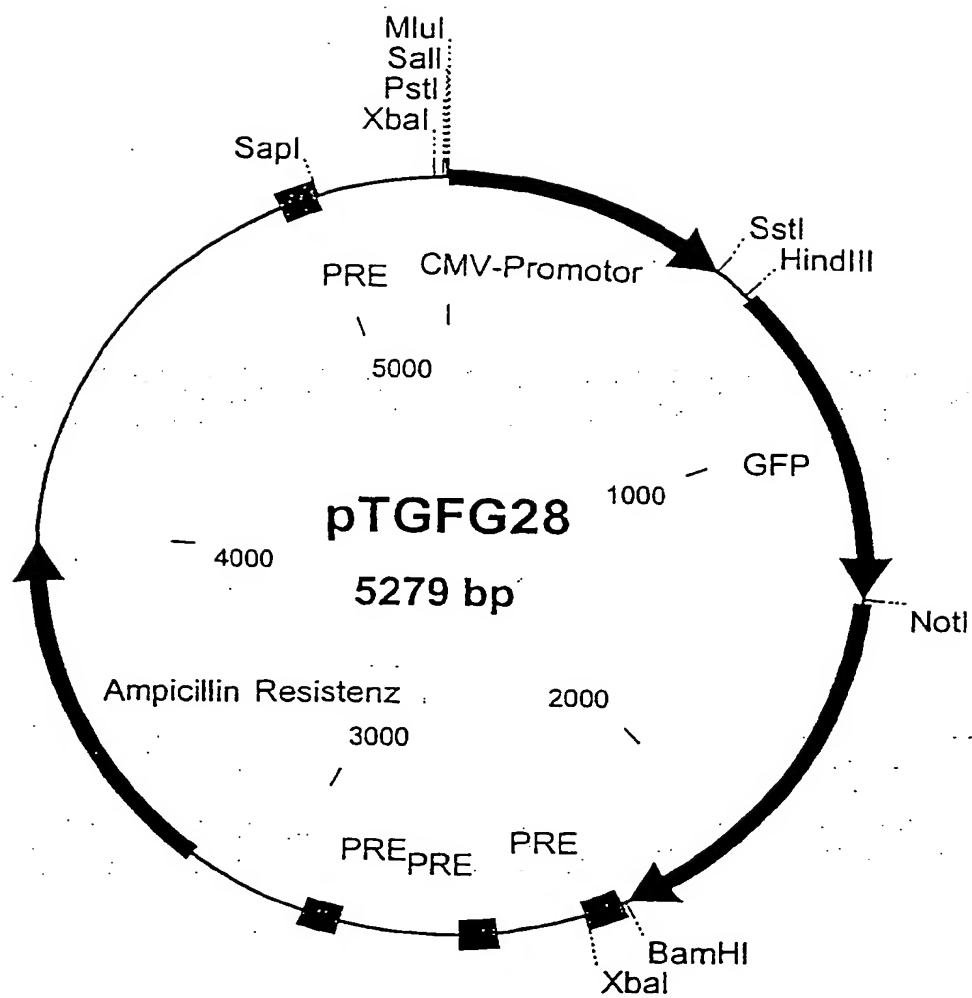


Abbildung 25

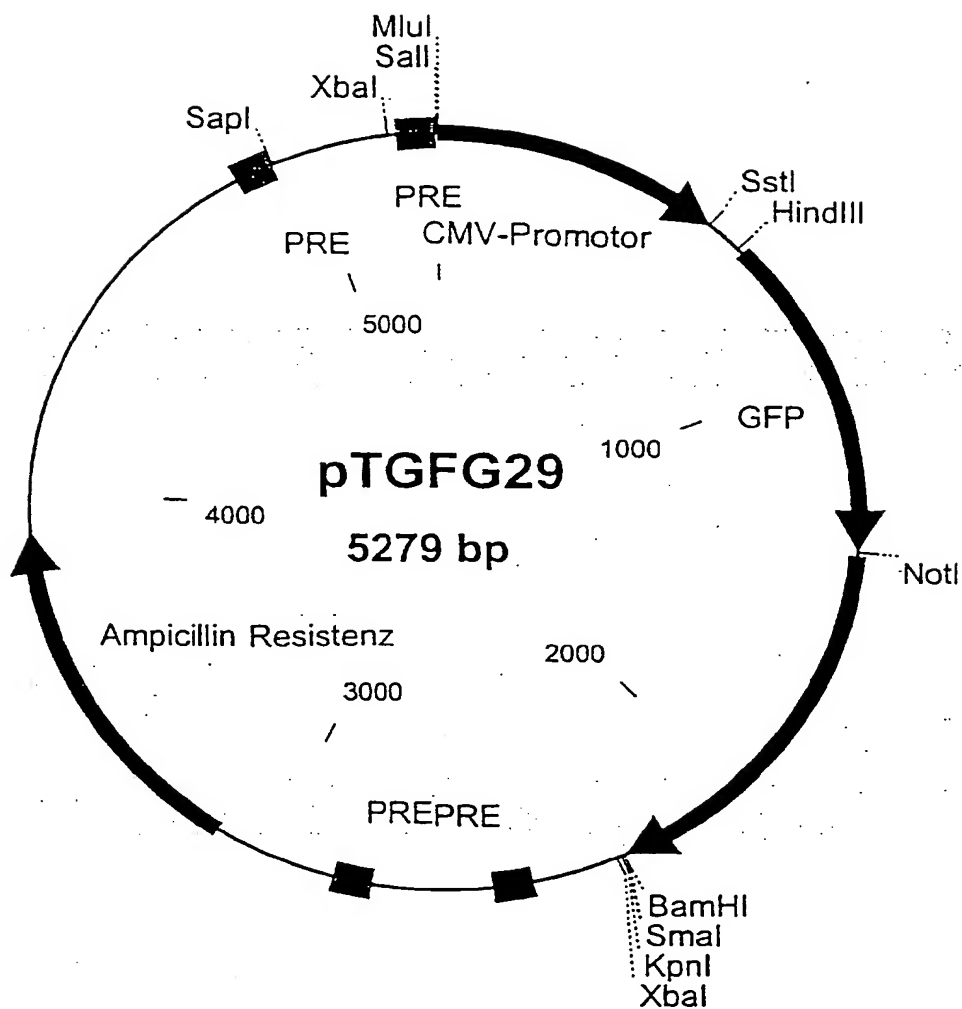


Abbildung 26

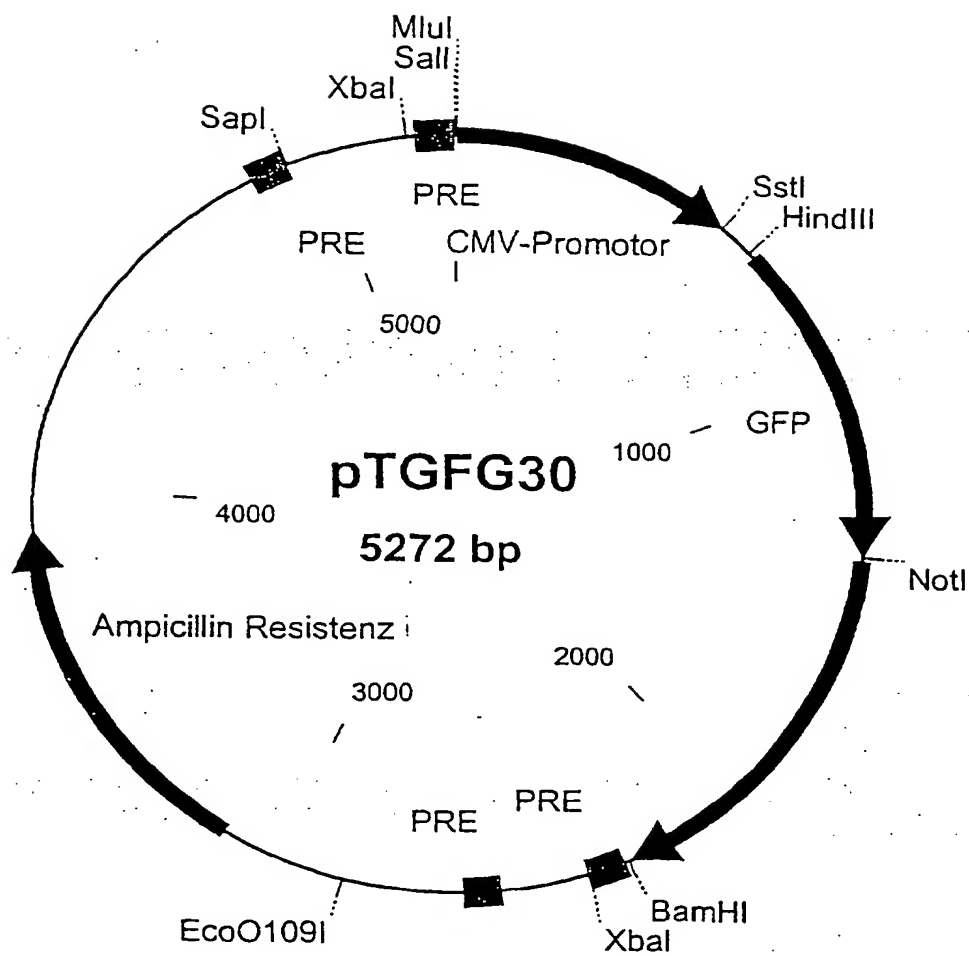


Abbildung 27

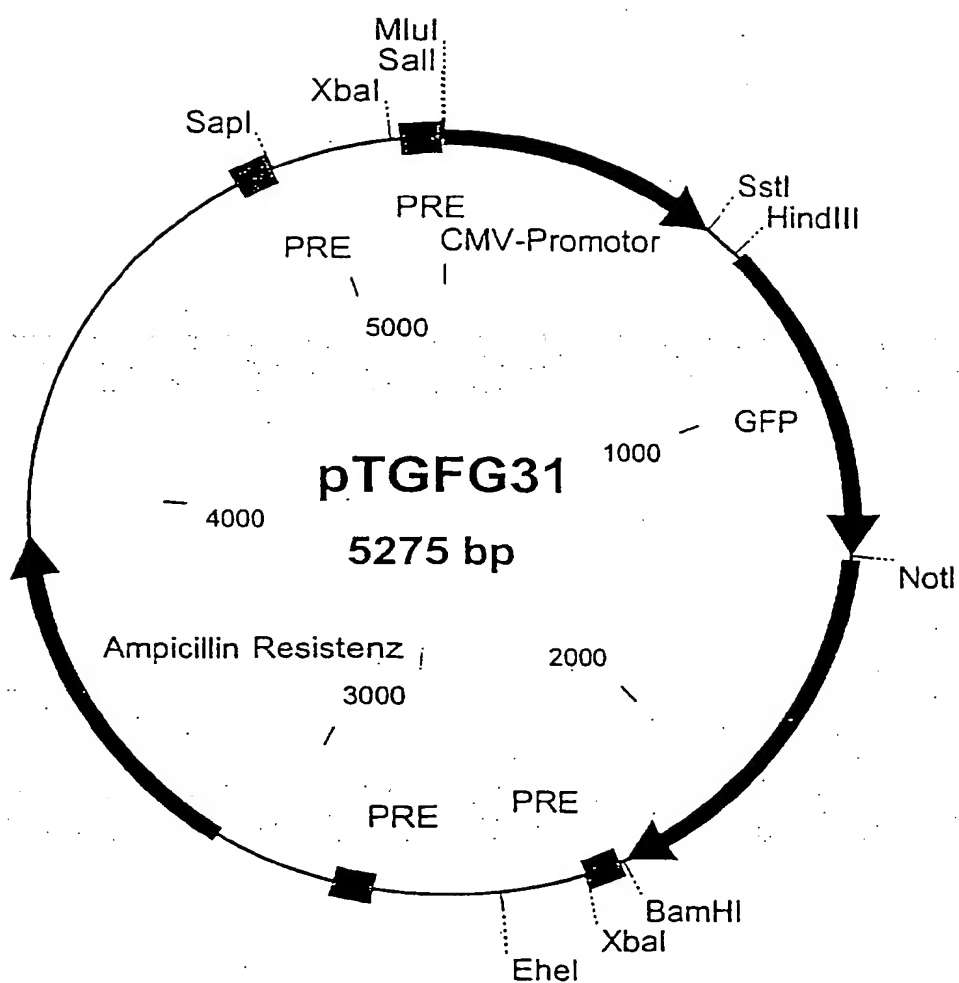


Abbildung 28

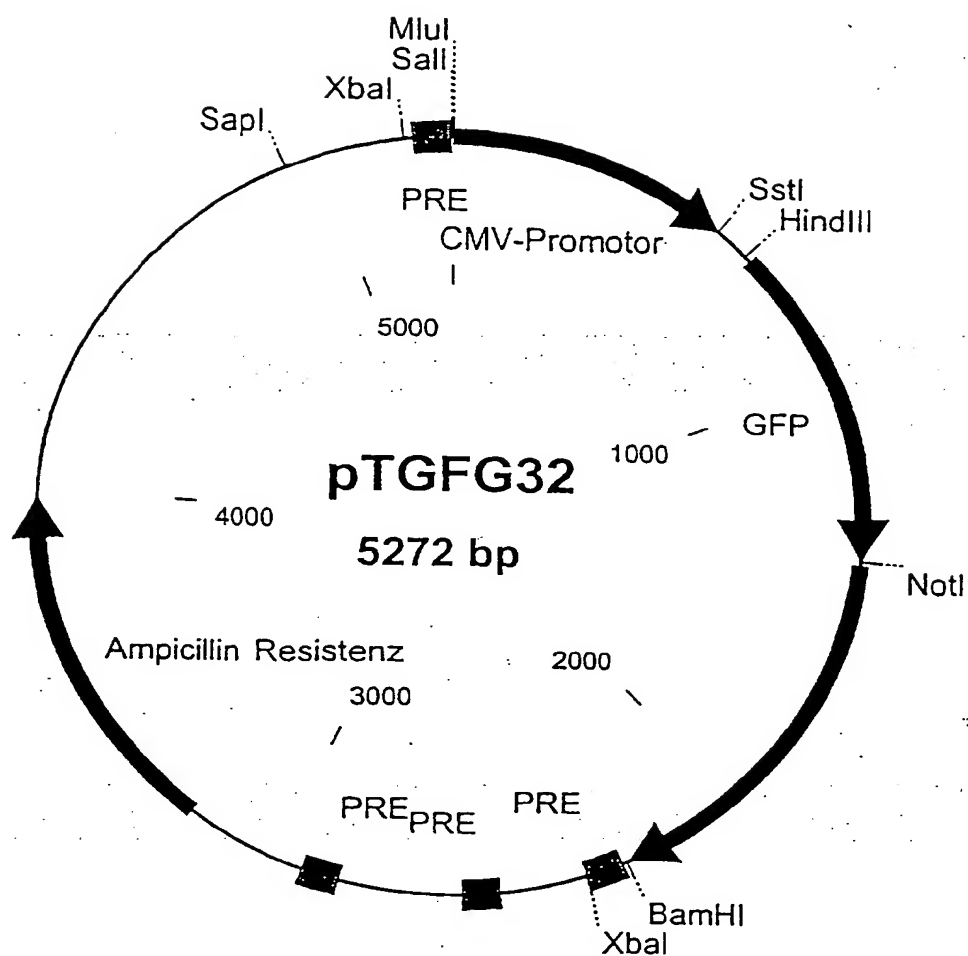


Abbildung 29

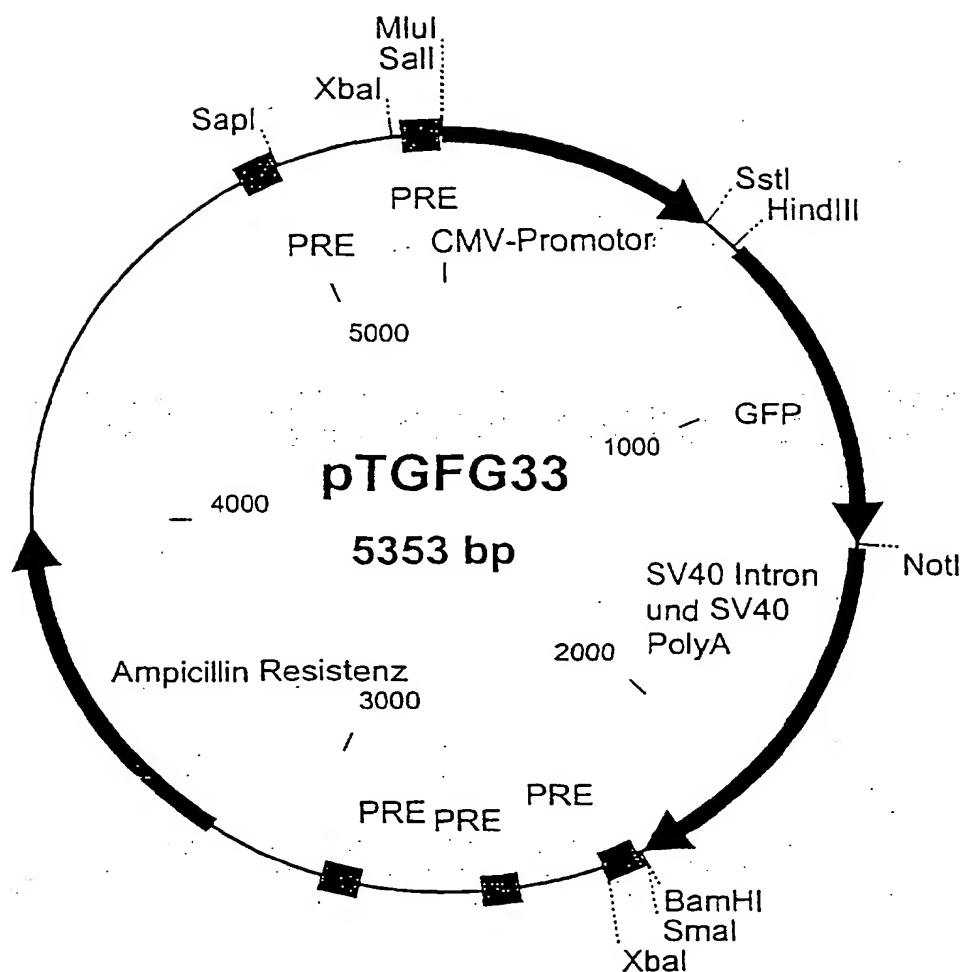


Abbildung 30

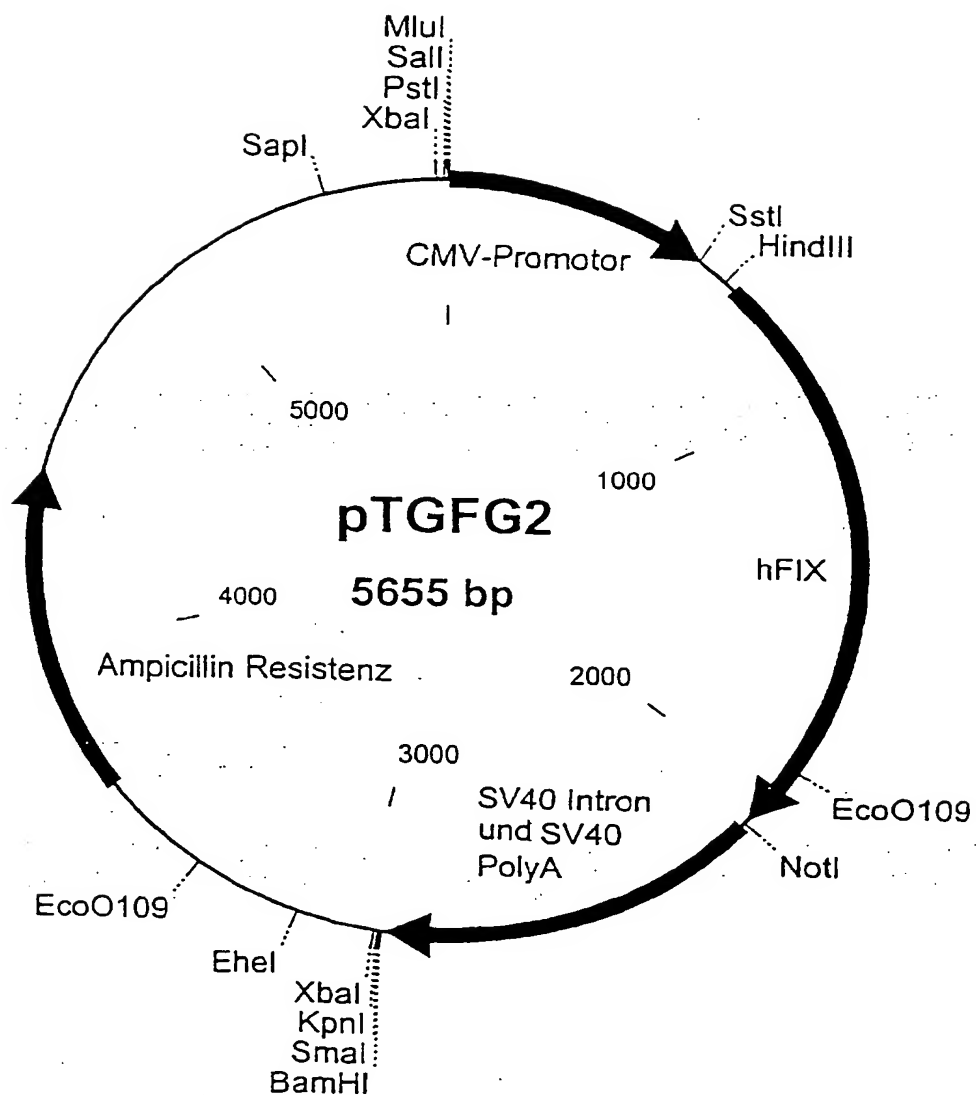


Abbildung 31

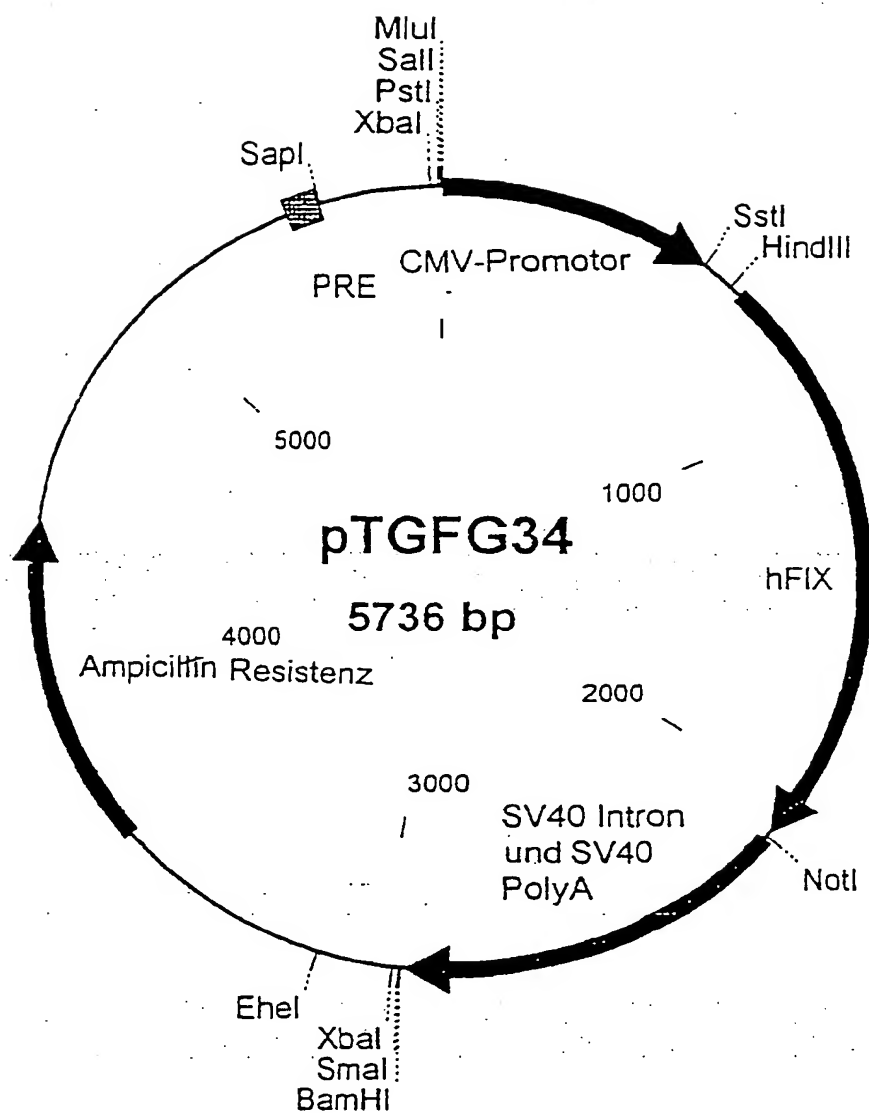


Abbildung 32

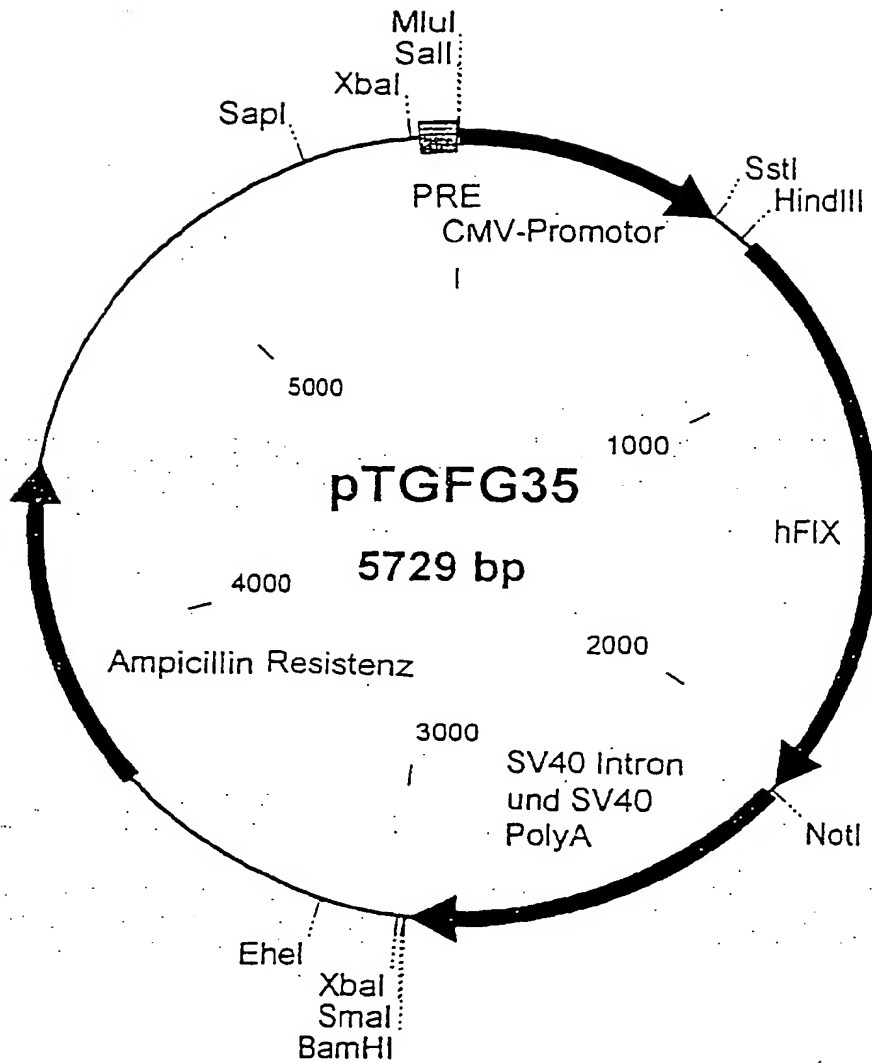


Abbildung 33

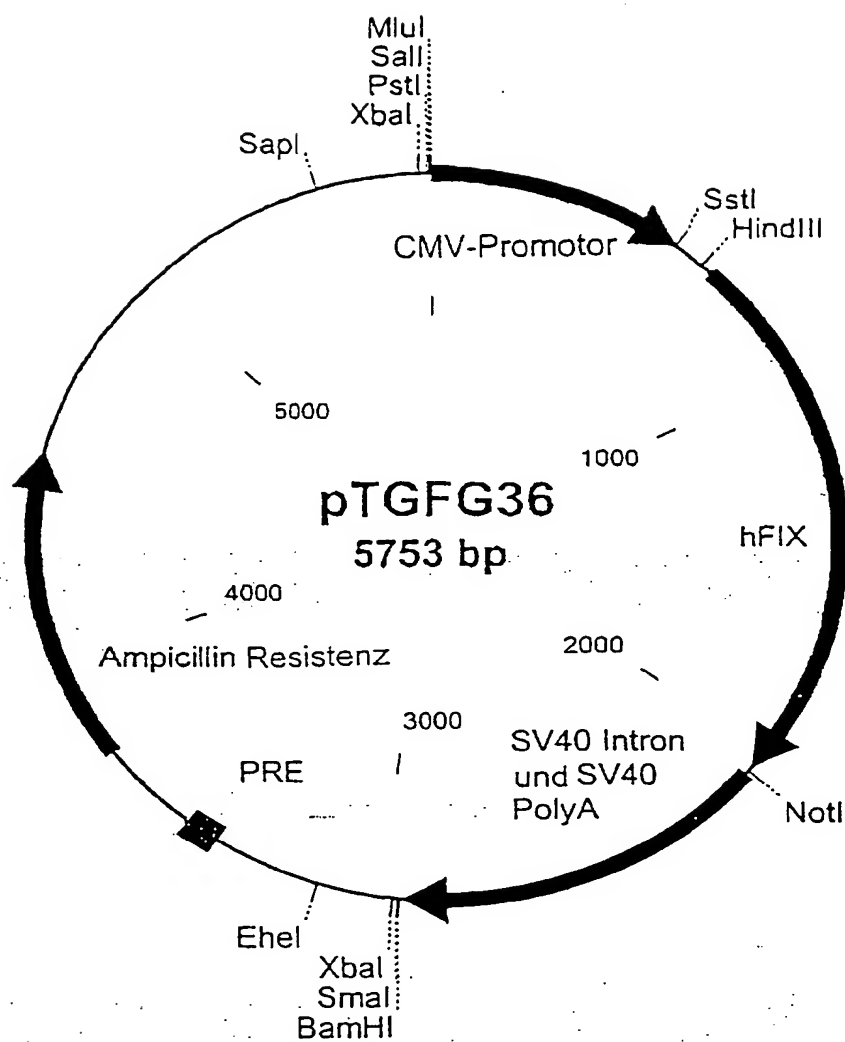


Abbildung 34

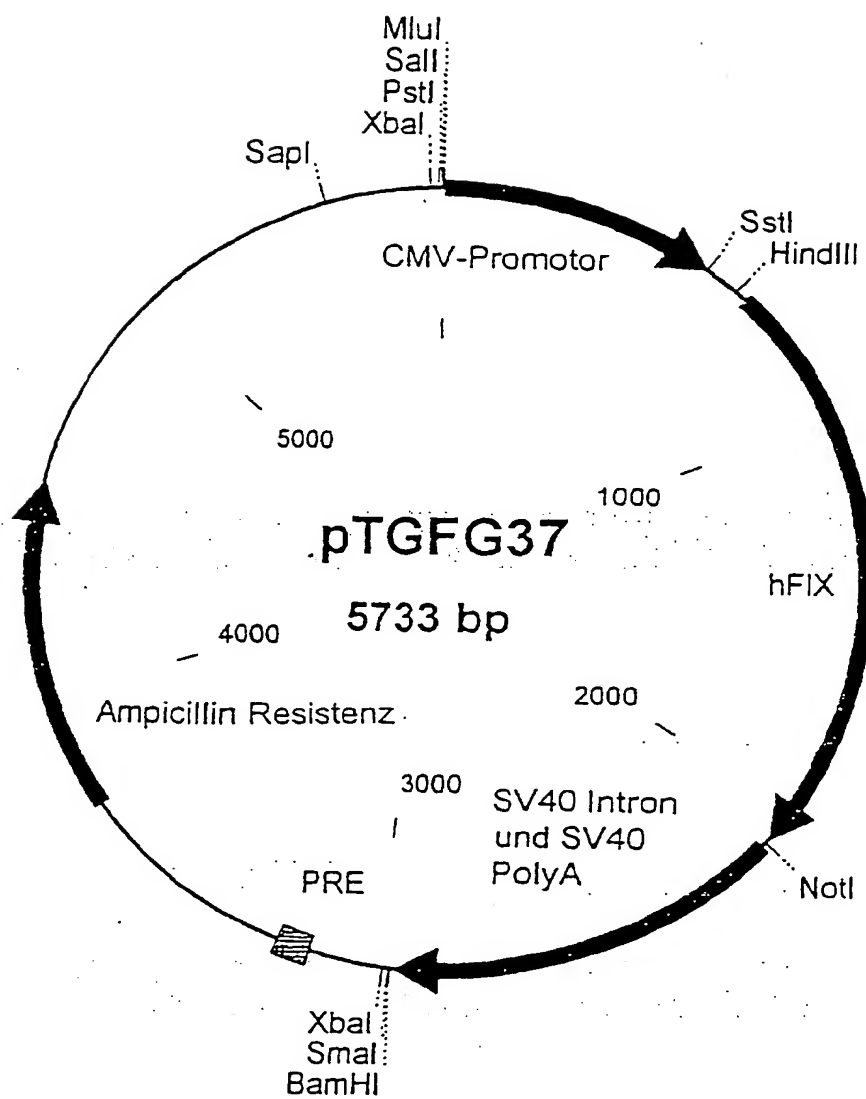


Abbildung 35

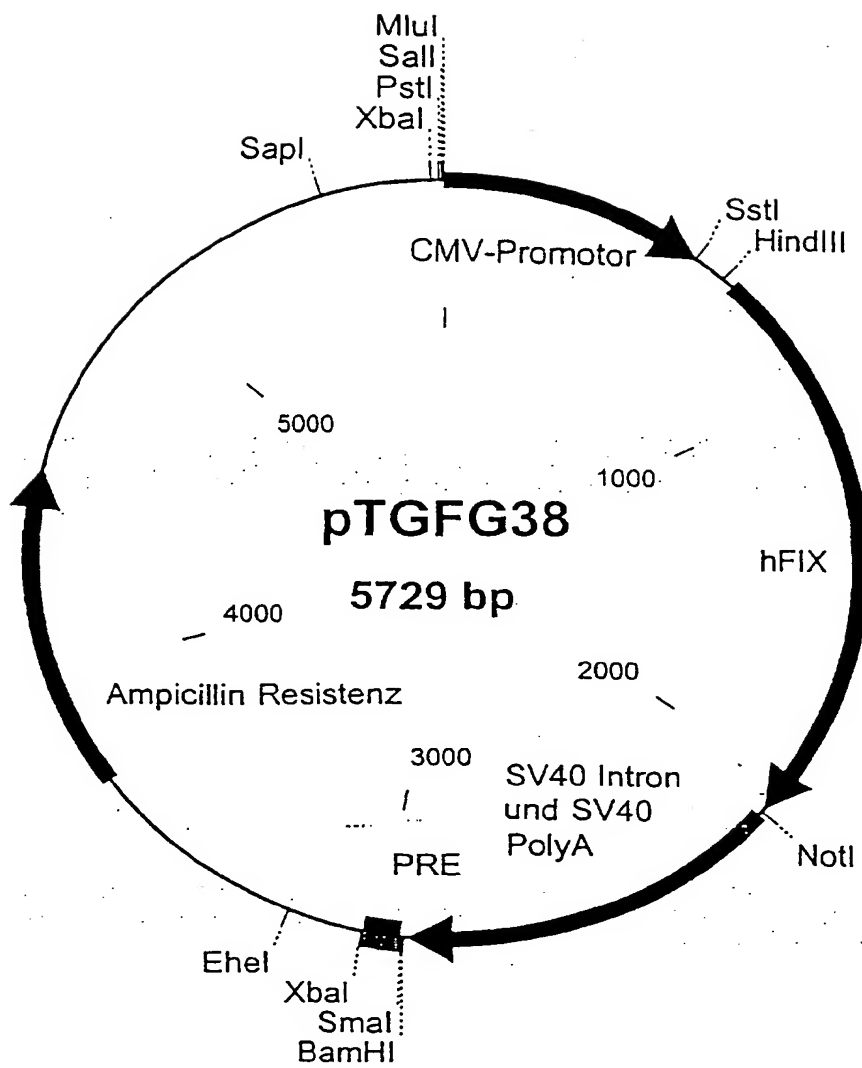


Abbildung 36

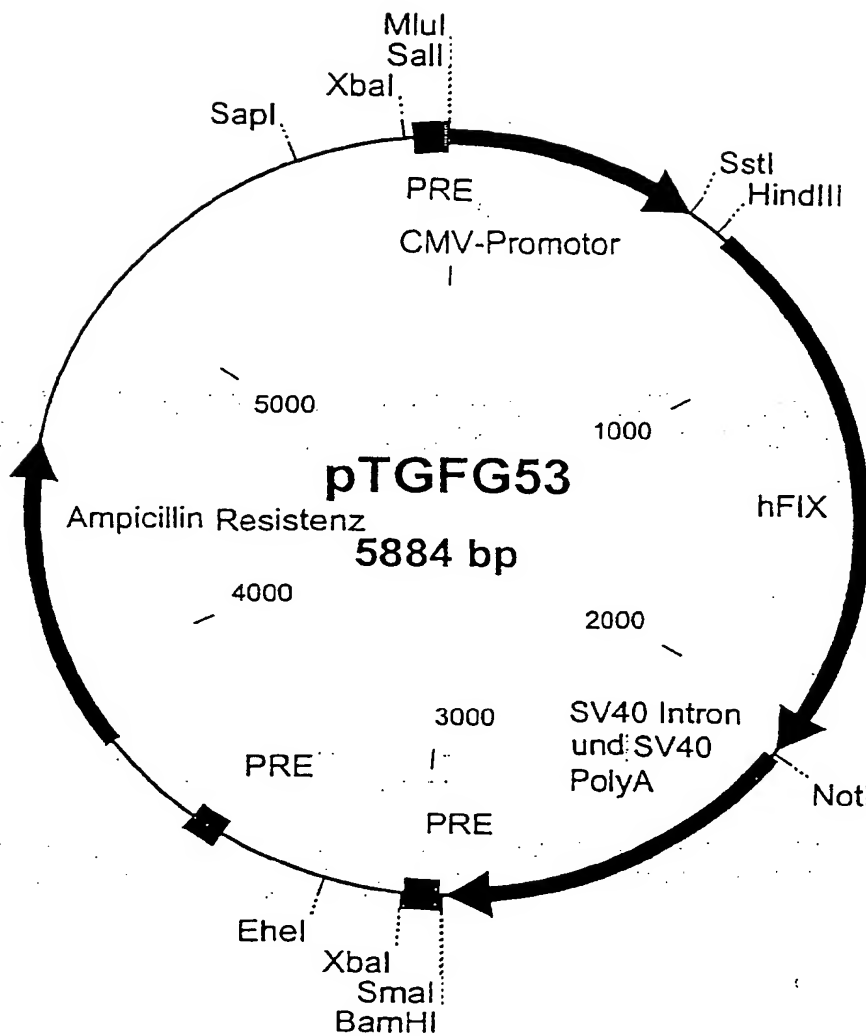


Abbildung 37

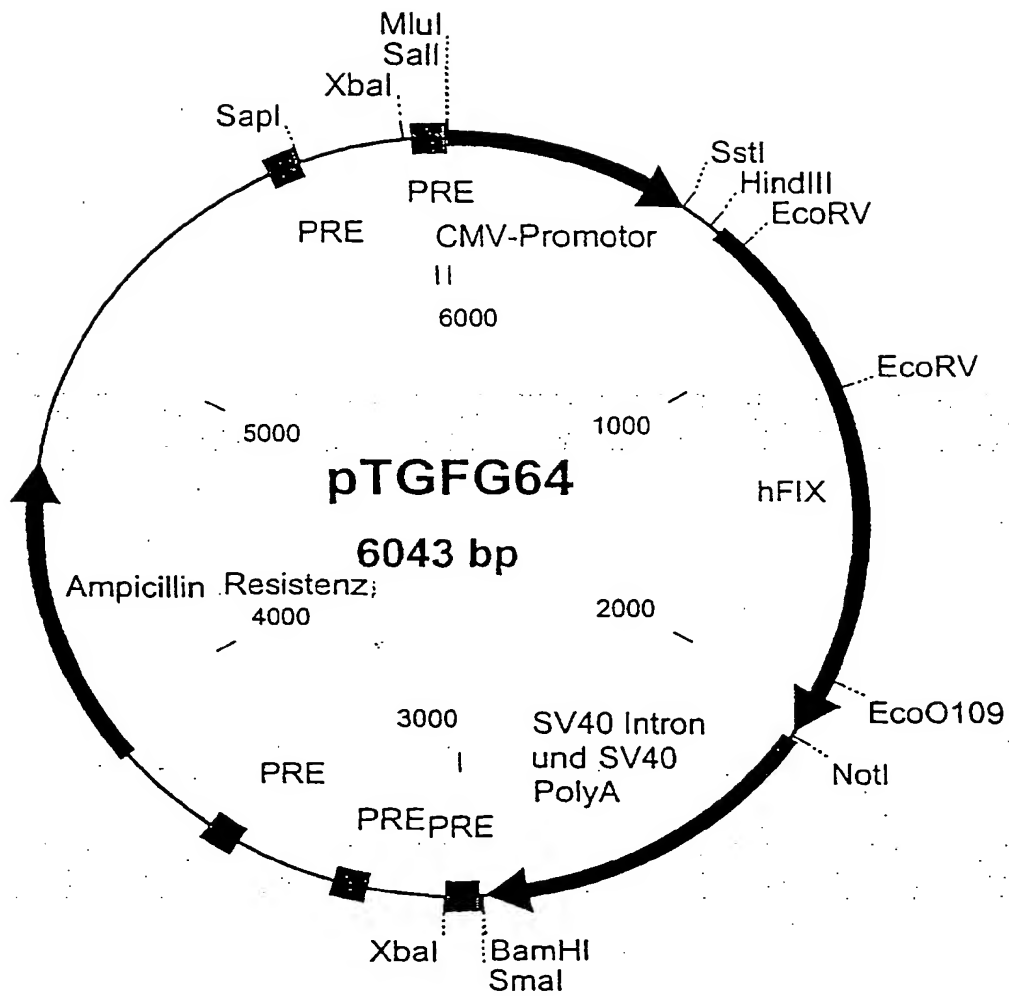


Abbildung 38

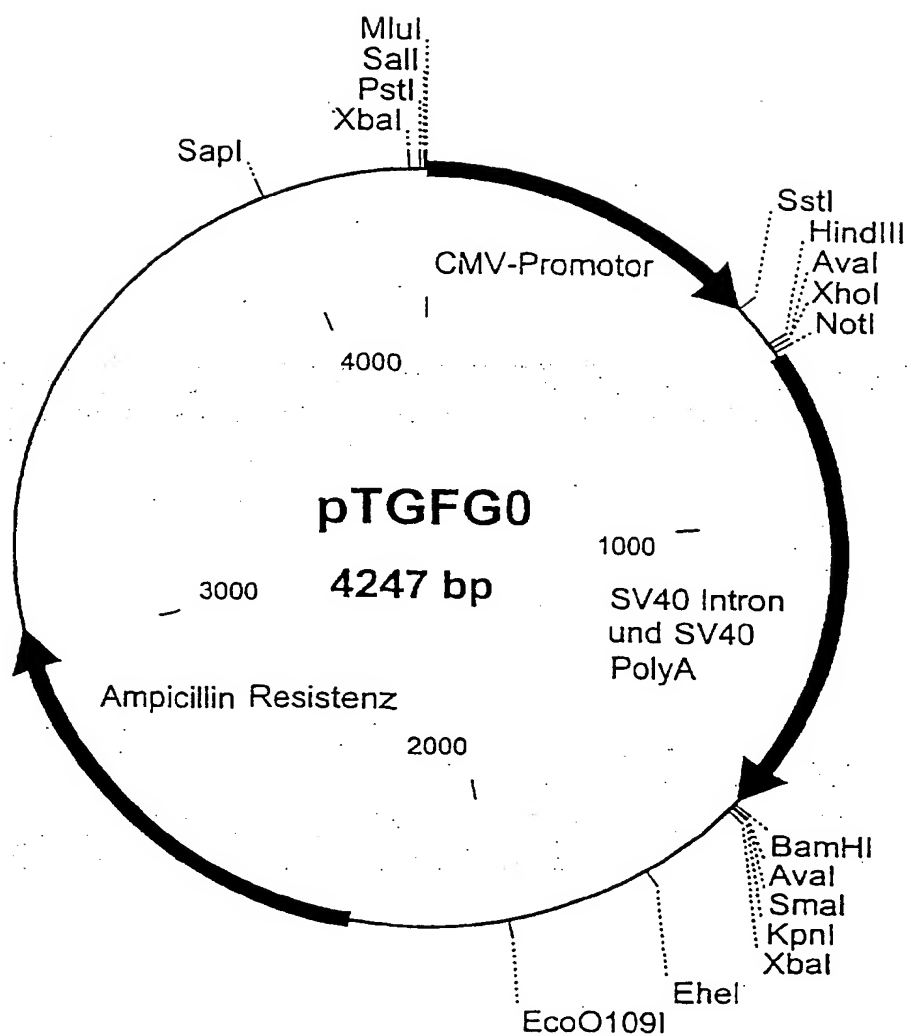


Abbildung 39

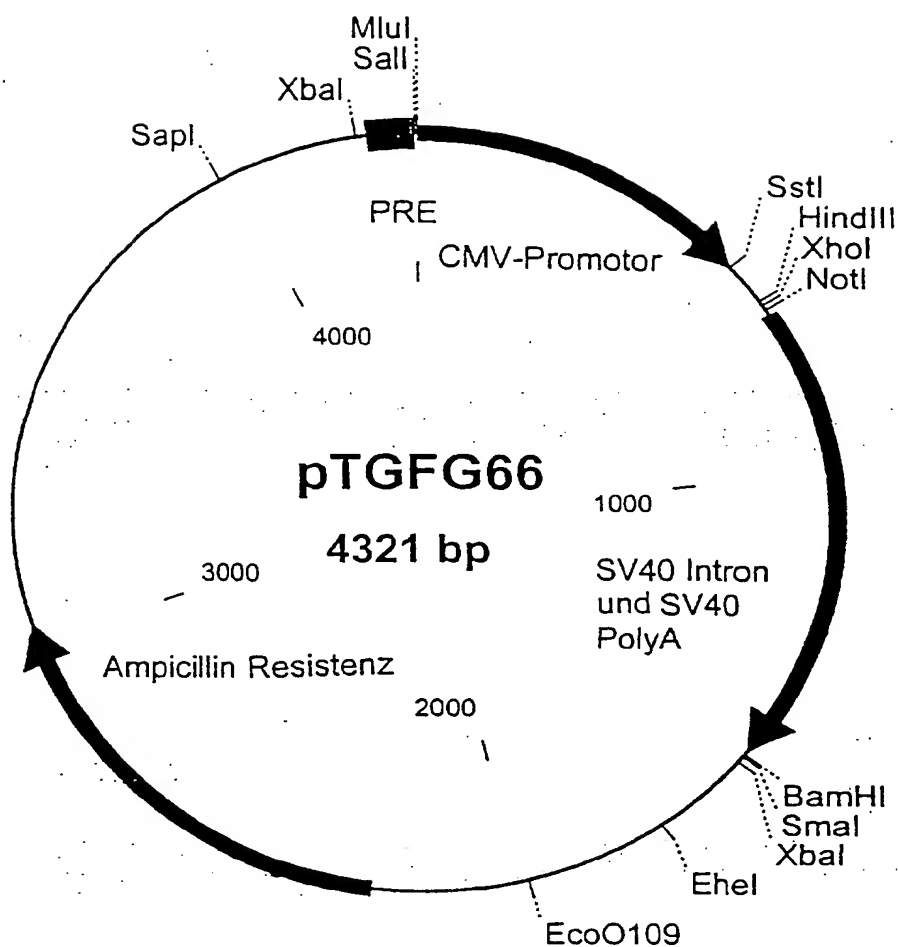


Abbildung 40

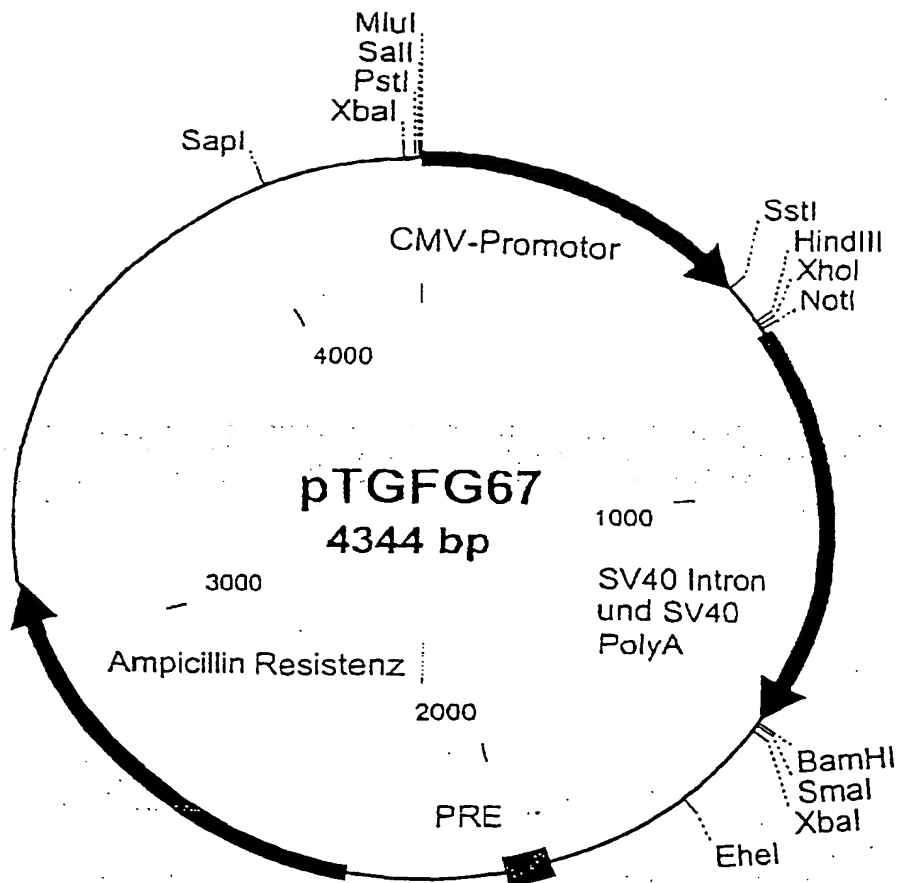


Abbildung 41

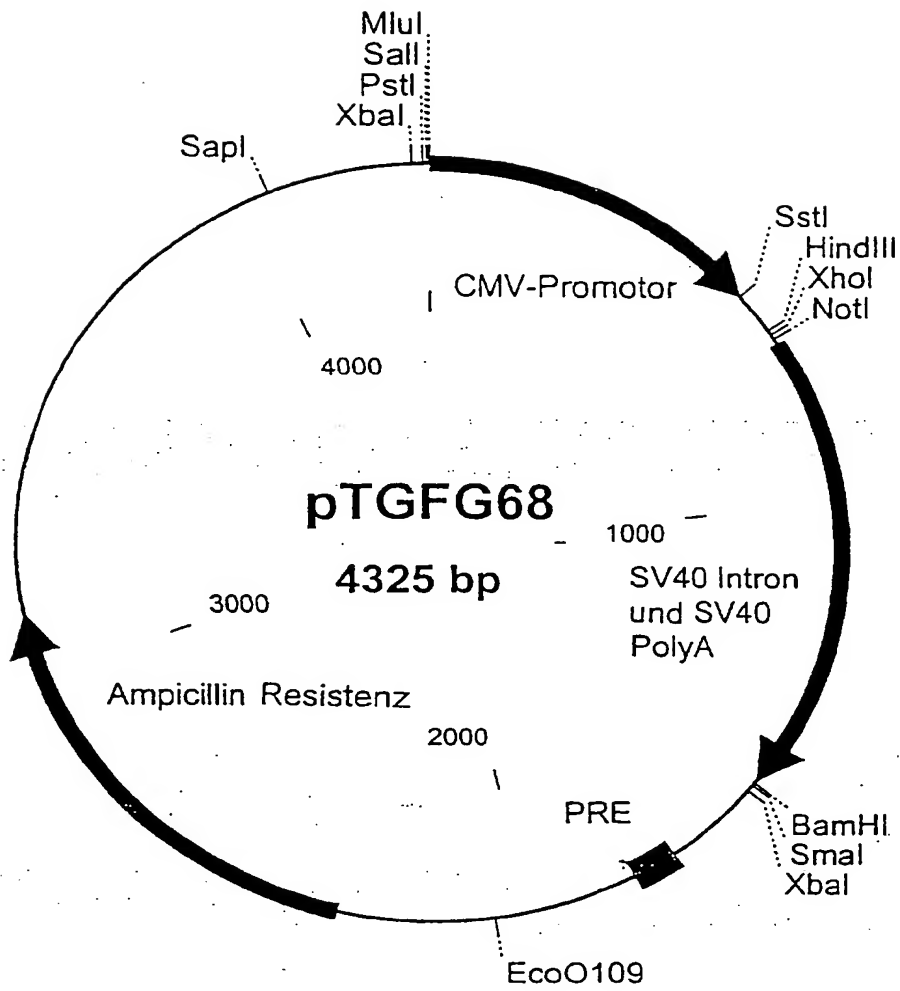


Abbildung 42

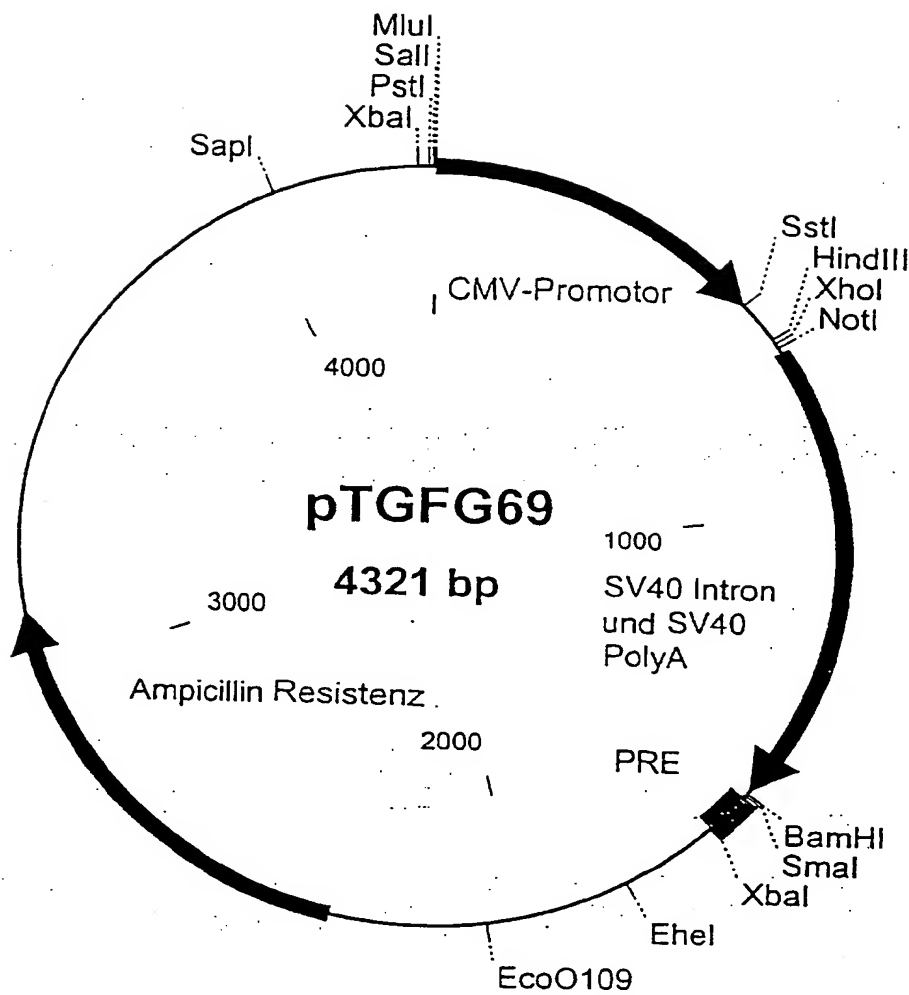


Abbildung 43

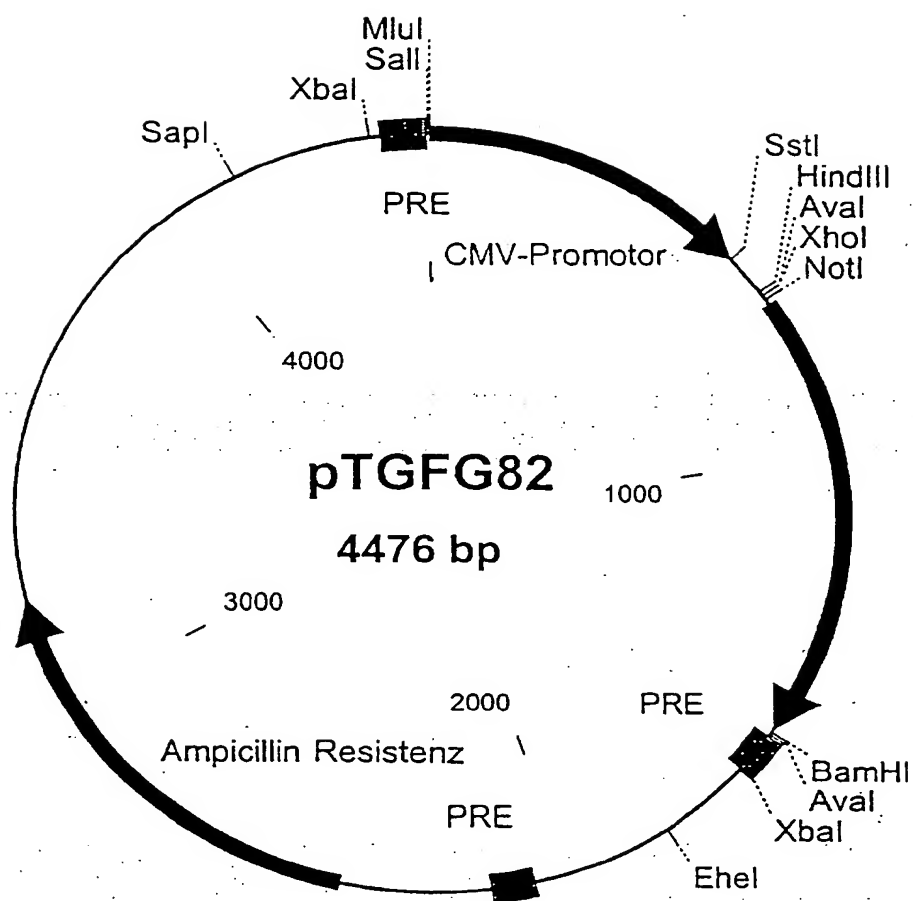


Abbildung 44

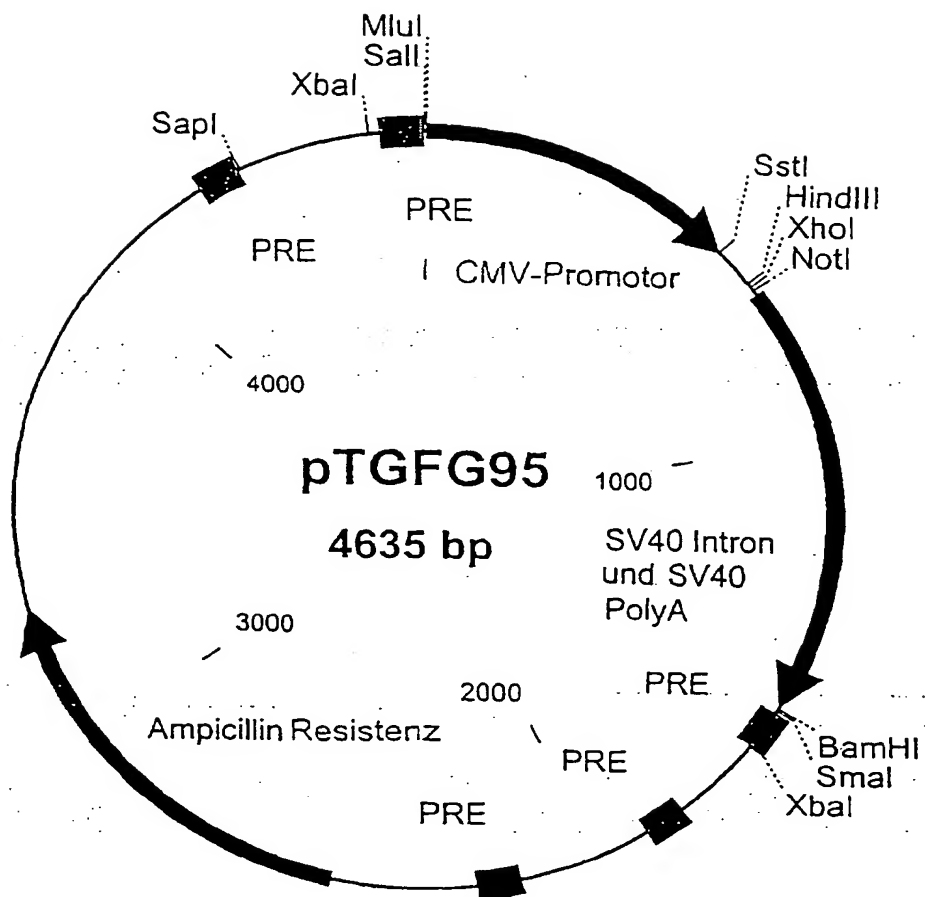


Abbildung 45

Sequenz pTGFG36 13.1.1993 20:18 Uhr

1 seq pTGFG36	CCCGTTGACA	TTGATTATTC	ACTAGTTTAT	ATTAGTAATC	AATTACCGCG
1 seq pTGFG36	TCATTAGTTC	ATAGCCCATC	TATGGAGTTC	CGCGTTACAT	AATTACCGGT
1 seq pTGFG36	AAATGGCCCG	CCTGGCTGAC	CGCCCAACGA	CCCCCCCCCA	TTGACGTCAA
1 seq pTGFG36	TAATGACGTA	TGTTCCCATC	GTAACGCCAA	TAGGGACTTT	CCATTGACGT
1 seq pTGFG36	CAATGGGTGG	AGTATTTACG	GTAACCTGCC	CACTTGGCAG	TACATCAAGT
1 seq pTGFG36	GTATCATATG	CCAAGTACGC	CCCCTATTGA	CGTCAATGAC	GGTAATGGC
1 seq pTGFG36	CCGCCTGGCA	TTATGCCCAG	TACATGACCT	TATGGGACTT	TCCTACTTGG
1 seq pTGFG36	CAGTACATCT	ACGTATTAGT	CATCCCTATT	ACCATCGTGA	TGCGGTTTTG
1 seq pTGFG36	GCAGTACATC	ATGGGGCGTG	GATAGCGGTT	TGACTCACCG	GGATTTCCAA
1 seq pTGFG36	GTCTCCACCC	CATTGACGTC	ATGGGGAGTT	TGTTTTGGCA	CCAAAATCAA
1 seq pTGFG36	CGGGACTTTC	CAAAATGTCT	TAACAACTCC	GCCCCATGTA	CGCAAATGGG
1 seq pTGFG36	CGGTAGGCGT	GTACGGTGGG	AGGTCTATAT	AAGCAGAGCT	CTCTGGCTAA
1 seq pTGFG36	CTAGAGAACC	CACTGCTTAC	TGGCTTATCG	AAATTAATAC	GACTCACTAT
1 seq pTGFG36	AGGGAGACCC	AGCTTGCAT	GCCAATTCGG	CAAAGGTTAT	GCAGCGCGTG
1 seq pTGFG36	AACATGATCA	TGGCAGAATC	ACCAGGCCTC	ATCACCATCT	GCCTTTTAGG
1 seq pTGFG36	ATATCTACTC	AGTGCTGAAT	GTACAGTTTT	TCTTGATCAT	GAAAACGCCA
1 seq pTGFG36	ACAAAATTCT	CAATCGGCCA	AGAGGTATA	ATTCACGTAA	ATTGGAAGAG
1 seq pTGFG36	TTTGTTCAAG	GGAACCTTGA	GAGAGAATGT	ATGGAAGAAA	AGTGTAGTTT
1 seq pTGFG36	TGAAGAAGCA	CGAGAAGTTT	TTGAAAACAC	TGAAGAACA	ACTGAATTTT

sequenz pTGFG36 13.12.1993 20:16 Uhr					
	960	970	980	990	1000
seq pTGFG36	GGAAGCAGTA	TGTTGATGGA	GATCAGTGTG	AGTCCCATCC	ATGTTTAAAT
	1010	1020	1030	1040	1050
seq pTGFG36	GGCGGCAGTT	GCAAGGATGA	CATTAAATCC	TATGAATGTT	GCTGTCCTT
	1060	1070	1080	1090	1100
seq pTGFG36	TGGATTGAA	GGAAAGAACT	GTGAATTAGA	TGTAAACATGT	AACATTAAGA
	1110	1120	1130	1140	1150
seq pTGFG36	ATGGCAGATG	CGAGCAGTTT	TGTAAATAATA	GTGCTGATAA	CAAGGTGGTT
	1160	1170	1180	1190	1200
seq pTGFG36	TGCTCCTGTA	CTGAGGGATA	TGCACTTGCA	GAAACCAGA	AGTCCTGTGA
	1210	1220	1230	1240	1250
seq pTGFG36	ACCAGCAGTG	CCATTTCAT	GTGGAAGAGT	TTCTGTTTCA	CAAACCTCTA
	1260	1270	1280	1290	1300
seq pTGFG36	AGCTCACCCG	TGCTGAGACT	GTTTTCTCTG	ATGTGGACTA	TGTAAATTCT
	1310	1320	1330	1340	1350
seq pTGFG36	ACTGAAGCTG	AAACCATTTT	GGATAACATC	ACTCAAGCA	CCCAATCATT
	1360	1370	1380	1390	1400
seq pTGFG36	TAATGACTTC	ACTCGGGTGT	TGGTGAGAGA	AGATGCCPAA	CCAGGTCAAT
	1410	1420	1430	1440	1450
seq pTGFG36	TCCCTTGGCA	GGTTGTTTGT	AATGGTAAAG	TTGATGCAAT	CTGTGGAGGC
	1460	1470	1480	1490	1500
seq pTGFG36	TCTATCGTTA	ATGAAATMTG	GATTGTAAC	GCTGCCCACT	GTGTTGAAAC
	1510	1520	1530	1540	1550
seq pTGFG36	TGGTGTTAAA	ATTACAGTTG	TGCAGGTGA	ACATAATATT	GAGGAGACAG
	1560	1570	1580	1590	1600
seq pTGFG36	AACATACAGA	GCAAAAGCGA	AATGTGATTG	GAATTATTC	TCACCACAAC
	1610	1620	1630	1640	1650
seq pTGFG36	TACAATGCAG	CTATTATTA	GTACAACCAT	GACATTGCC	TTCTGGAAC
	1660	1670	1680	1690	1700
seq pTGFG36	GGACGAACCC	TTAGTGCTAA	ACAGCTACGT	TACACCTATT	TGCATTGCTG
	1710	1720	1730	1740	1750
seq pTGFG36	ACAAGGAATA	CACGAACATC	TTCTCAAAT	TGGATCTGG	CTATGTAAGT
	1760	1770	1780	1790	1800
seq pTGFG36	GGCTGGGGAA	GAGTCTTCCA	CAAAGGGAGA	TCAGCTTTAG	TTCTTCAGTA
	1810	1820	1830	1840	1850
seq pTGFG36	CCTTAGAGTT	CCACTTGTG	ACCGAGCCAC	ATGTCTTCGA	TCTACAAAGT
	1860	1870	1880	1890	1900
seq pTGFG36	TCACCATCTA	TAACAACATG	TTCTGTGCTG	GCTTCCATGA	AGGAGGTAGA

sequenz pTGFG36 13.12.1998 20:16 Uhr					
	1910	1920	1930	1940	1950
seq pTGFG36	GATTCATGTC	AAGGAGATAG	TGGGGGACCC	CATGTTACTG	AAGTGGRAGG
	1960	1970	1980	1990	2000
seq pTGFG36	GACCACTTTC	TAACTGGAA	TTATTAGCTG	GGGTGAAGAG	TGTGCAATGA
	2010	2020	2030	2040	2050
seq pTGFG36	AAGGCAATA	TGGAATATAT	ACCAAGGTAT	CCCGGTATGT	CAACTGGATT
	2060	2070	2080	2090	2100
seq pTGFG36	AAGGAAAAA	CRAAGCTCAC	TTAATGGGAT	CGGTCCAGCG	GCCGCGACTC
	2110	2120	2130	2140	2150
seq pTGFG36	TACTAGAGGA	TCTTTGTGAA	GGAACCTTAC	TTCTGTGCTG	TGACATAATT
	2160	2170	2180	2190	2200
seq pTGFG36	GGACAAACTA	CCTACAGAGA	TTAAAGCTC	TAAAGGTAAAT	ATAAAATTTT
	2210	2220	2230	2240	2250
seq pTGFG36	TAAGTGATA	ATGTGTTAAA	CTACTGATTC	TAATTGTTTG	TGTATTTTAG
	2260	2270	2280	2290	2300
seq pTGFG36	ATTCCAACCT	ATGGAAGTGA	TGAATGGGAG	CAGTGGTGGG	ATGCCTTTAA
	2310	2320	2330	2340	2350
seq pTGFG36	TGAGGAAAC	CTGTTTGTCT	CAGAAGAAT	GCCATCTAGT	GATGATGAGG
	2360	2370	2380	2390	2400
seq pTGFG36	CTACTGCTGA	CTCTCAACAT	TCTACTCCTC	CAAAAAGAA	GAGAAAGGTA
	2410	2420	2430	2440	2450
seq pTGFG36	GAAGACCCCA	AGGACTTTCC	TTCAAGATTG	CTAAGTTTTT	TGAGTCATGC
	2460	2470	2480	2490	2500
seq pTGFG36	TGTGTTTAGT	AATAGAACTC	TGCTTGCTT	TGCTATTTAC	ACCACAAAGG
	2510	2520	2530	2540	2550
seq pTGFG36	AAAAAGCTGC	ACTGCTATAC	AAGAAAATTA	TGGAATAATA	TTCTGTAACC
	2560	2570	2580	2590	2600
seq pTGFG36	TTTATAAGTA	GGCATAACAG	TTATAATCAT	AACATACTGT	TTTTTCTTAC
	2610	2620	2630	2640	2650
seq pTGFG36	TCCACACAGG	CATAGAGTGT	CTGCTATTAA	TAACTATGCT	CAAAAATGTG
	2660	2670	2680	2690	2700
seq pTGFG36	GTACCTTTAG	CTTTTAAATT	TGTAAAGGGG	TTAATAGGA	ATATTGATG
	2710	2720	2730	2740	2750
seq pTGFG36	TATAGTGCCT	TGACTAGAGA	TCATAATCAG	CCATACCACA	TTGTAGAGG
	2760	2770	2780	2790	2800
seq pTGFG36	TTTTACTTGC	TTTAAAAAAC	CTCCACACAC	TCCCCCTGAA	CCTGAACAT
	2810	2820	2830	2840	2850
seq pTGFG36	AAAATGAATG	CAATGTTTGT	TGTTAACTTG	TTTATTGCAG	CTTATAATGC

sequenz pTGFG36 13.12.1993 20:16 Uhr

seq pTGFG36	2860	2870	2880	2890	2900
	TTACCAATTA	AGCAATAGCA	TCACAAATTT	CACAAATAAA	GCATTTTTTT
seq pTGFG36	2910	2920	2930	2940	2950
	CACTGCATTC	TAGTTGTGGT	TGTCCAAAC	TCATCAATGT	ATCTTATCAT
seq pTGFG36	2960	2970	2980	2990	3000
	GTCTGGATCC	CCGGGTACCC	TCTAGAGCGA	ATTAAATCAC	TGGCCGTCGT
seq pTGFG36	3010	3020	3030	3040	3050
	TTTACAACGT	CGTACTGGG	AAAACCCTGG	CGTTACCCAA	CTTAATCGCC
seq pTGFG36	3060	3070	3080	3090	3100
	TTGCAGCACA	TCCCCCTTC	GCCAGCTGGC	GTAATAGCGA	AGAGGCCCGC
seq pTGFG36	3110	3120	3130	3140	3150
	ACCGATCGCC	CTTCCCAACA	GTTCGCGAGC	CTGAATGGCG	AATGGCGCCT
seq pTGFG36	3160	3170	3180	3190	3200
	GATGCGGTAT	TITCTCCTTA	CGCATCTGTG	CGGTATTTC	CACCGCATAT
seq pTGFG36	3210	3220	3230	3240	3250
	GGTGCACTCT	CAGTACAATC	TGCTCTGATG	CCGCATAGTT	AAGCCAGCCC
seq pTGFG36	3260	3270	3280	3290	3300
	CGACACCCGC	CAACACCCGC	TGACGCGCCC	TGACGCGCTT	GTCTGCTCCC
seq pTGFG36	3310	3320	3330	3340	3350
	GGCATCCGCT	TACAGACAAG	CTGTGACCGT	CTCCGGGAGC	TGCATGTGTC
seq pTGFG36	3360	3370	3380	3390	3400
	AGAGGTTTTT	ACCGTCATCA	CCGAAACGCG	CGAGACGAAA	GCGGGGGTAC
seq pTGFG36	3410	3420	3430	3440	3450
	CAGCTTCGTA	GCTAGAACAT	CATGTTCTGG	GATATCAGCT	TCGTAGCTAG
seq pTGFG36	3460	3470	3480	3490	3500
	AACATCATGT	TCTGGTACCC	CCCTCGTGAT	ACGCCTATTT	TTATAGGTTA
seq pTGFG36	3510	3520	3530	3540	3550
	ATGTCATGAT	AATAATGGTT	TCTTAGACGT	CAGGTGSCAC	TTTCGGGGA
seq pTGFG36	3560	3570	3580	3590	3600
	AATGTGCGCG	GAACCCCTAT	TGTTTTATTT	TTCTAATAC	ATTCAAATAT
seq pTGFG36	3610	3620	3630	3640	3650
	GTATCCGCTC	ATGAGACAAT	AACCCTGATA	AATGCTTCAA	TAATATTGAA
seq pTGFG36	3660	3670	3680	3690	3700
	AAGAGGAAGAG	TATGAGTATT	CAACATTTCC	GTGTCCGCCT	TATTCCTTTT
seq pTGFG36	3710	3720	3730	3740	3750
	TTTGCGGCAT	TTGCCTTCC	TGTTTTGCT	CACCCAGAAA	CGCTGGTGAA
seq pTGFG36	3760	3770	3780	3790	3800
	AGTAAAGAT	GCTGAAGATC	AGTTGGGTGC	ACGAGTGGGT	TACATCGAAC

sequenz pTGFG36 13.12.1998 20:16 Uhr

	3810	3820	3830	3840	3850
seq pTGFG36	TGGATCTCAA	CAGCGGTAAG	ATCCTTGAGA	GTTTTCGCCC	CGAAGAACGT
	3860	3870	3880	3890	3900
seq pTGFG36	TTTCCAATGA	TGAGCACTTT	TAAAGTTCTG	CTATGTGGCG	CGGTATTATC
	3910	3920	3930	3940	3950
seq pTGFG36	CCGTATTGAC	GCCGGGCAAG	AGCAACTCGG	TCGCCGCATA	CACTATTCTC
	3960	3970	3980	3990	4000
seq pTGFG36	AGAATGACTT	GGTTGAGTAC	TCACCACTCA	CAGAAAAGCA	TCTTACGGAT
	4010	4020	4030	4040	4050
seq pTGFG36	GGCATGACAG	TAAGAGAATT	ATGCAGTGCT	GCCATPACCA	TGAGTGATAA
	4060	4070	4080	4090	4100
seq pTGFG36	CACTGCGGCC	ACTTACTTTC	TGACAACGAT	CGGAGGACCG	AAGGAGCTAA
	4110	4120	4130	4140	4150
seq pTGFG36	CCGCTTTTTC	GCACAACATG	GGGGATCATG	TAACTCGCCT	TGATCGTTGG
	4160	4170	4180	4190	4200
seq pTGFG36	GAACCGGAGC	TGAATGAAGC	CATACCAAAC	GACGAGCGTG	ACACCACGAT
	4210	4220	4230	4240	4250
seq pTGFG36	GCCTGTAGCA	ATGGCAACAA	CGTTGCGCAA	ACTATTAAC	GGCGAACTAC
	4260	4270	4280	4290	4300
seq pTGFG36	TTACTCTAGC	TCCCGGCAA	CAATTAATAG	ACTGGATGGA	GGCGGATAAA
	4310	4320	4330	4340	4350
seq pTGFG36	GTTGCAGGAC	CACTTCTGCG	CTCGGCCCTT	CCGGCTGGCT	GGTTTATTGC
	4360	4370	4380	4390	4400
seq pTGFG36	TGATAAATCT	GGAGCCGGTG	AGCGTGGGTC	TCGCGGTATC	ATTGCAGCAC
	4410	4420	4430	4440	4450
seq pTGFG36	TGGGCCCAGA	TGGTAAGCCC	TCCCGTATCG	TAGTTATCTA	CACGACGGGG
	4460	4470	4480	4490	4500
seq pTGFG36	AGTCAGGCAA	CTATGGATGA	ACGAAATAGA	CAGATCGCTG	AGATAGGTGC
	4510	4520	4530	4540	4550
seq pTGFG36	CTCACTGATT	AAGCATTGGT	AACGTGTCAGA	CCAGTTTAC	TCATATATAC
	4560	4570	4580	4590	4600
seq pTGFG36	TTTAGATTGA	TTTAAACTT	CATTTTAAAT	TTAAAGGAT	CTAGGTGAAG
	4610	4620	4630	4640	4650
seq pTGFG36	ATCCTTTTTC	ATAATCTCAT	GACCAAAATC	CCTTACGTC	AGTTTTCGTT
	4660	4670	4680	4690	4700
seq pTGFG36	CCACTGAGCG	TCAGACCCCG	TAGAAAAGAT	CAAAGGATCT	TCTTGAGATC
	4710	4720	4730	4740	4750
seq pTGFG36	CTTTTTTCT	GCGCGTAATC	TGCTGCTTGC	AAACAAAAAA	ACCACCGCTA

sequenz pTGFG36 13.12.1998 20:16 Uhr	
	4760 4770 4780 4790 4800
seq pTGFG36	CCAGCGGTGG TTGTTTGCC GGATCAAGAG CTACCAACTC TTTTCCGAA
	4810 4820 4830 4840 4850
seq pTGFG36	GGTAACTGGC TTCAGCAGAG CGCAGATACC AAATACTGTT CTTCTAGTGT
	4860 4870 4880 4890 4900
seq pTGFG36	AGCCGTAGTT AGGCCACCAC TTCAAGAACT CTGTAGCACC GCCTACATAC
	4910 4920 4930 4940 4950
seq pTGFG36	CTCGCTCTGC TAATCCTGTT ACCAGTGGCT GCTGCCAGTG GCGATAAGTC
	4960 4970 4980 4990 5000
seq pTGFG36	GTGTCTTACC GGGTTEGACT CAAGACGATA GTTACCGGAT AAGGCGCAGC
	5010 5020 5030 5040 5050
seq pTGFG36	GGTCGGGCTG AACGGGGGGT TCGTGCACAC AGCCAGCTT GGAGCGAACC
	5060 5070 5080 5090 5100
seq pTGFG36	ACCTACACCG AACTGAGATA CCTACAGCGT GAGCTATGAG AAAGCGCCAC
	5110 5120 5130 5140 5150
seq pTGFG36	GCTTCCCGAA GGGAGAAAGG CGGACAGGTA TCCGGTAAGC GGCAGGGTCG
	5160 5170 5180 5190 5200
seq pTGFG36	GAACAGGAGA GCGCAGGAG GAGCTTCCAG GGGGAAACCC CTGGTATCTT
	5210 5220 5230 5240 5250
seq pTGFG36	TATAGTCCTG TCGGGTTTCG CCACCTCTGA CTGAGCGTC GATTTTGTG
	5260 5270 5280 5290 5300
seq pTGFG36	ATGCTCGTCA GGGGGGCGGA GCCTATGGAA AAACGCCAGC AACCGGCCT
	5310 5320 5330 5340 5350
seq pTGFG36	TTTTACGGTT CCTGGCCTTT TGCTGGCCTT TTGCTCACAT GTTCTTTCCT
	5360 5370 5380 5390 5400
seq pTGFG36	GCGTTATCCC CTGATTCTGT GGATAACCGT ATTACCGCCT TTGAGTGAGC
	5410 5420 5430 5440 5450
seq pTGFG36	TGATACCGCT CGCCGCAGCC GAACGACCGA GCGCAGGAG TCAGTGAGCG
	5460 5470 5480 5490 5500
seq pTGFG36	AGGAAGCGGA AGAGCGCCCA ATACGCAAAC CGCCTCTCCC CGCGCGTTGG
	5510 5520 5530 5540 5550
seq pTGFG36	CCGATTCATT AATGCAGCTG GCACGACAGG TTCCCGACT GGAAAGCGGG
	5560 5570 5580 5590 5600
seq pTGFG36	CAGTGAGCGC AAGCAATTA ATGTGAGTTA GCTCACTCAT TAGGCACCCC
	5610 5620 5630 5640 5650
seq pTGFG36	AGGCTTTACA CTTTATGCTT CCGGCTCGTA TGTGTGTGG AATTGTGAGC
	5660 5670 5680 5690 5700
seq pTGFG36	GGATAACAAT TTCACACAGG AAACAGCTAT GACCATGATT ACGCCAGCT

sequenz pTGFG36	13.12.1998	20:16 Uhr			
	5710	5720	5730	5740	5750
seq pTGFG36	CTCTAGAGCT	CTAGAGCTCT	AGAGCTCTAG	AGAGCTTGCA	TGCCTGCAGG
	5760	5770	5780	5790	5800
seq pTGFG36	TCG				

Abbildung 12

1 seq PTGFG67	CCCGTTGACA TTGTTATTTC ACTACTTATT ATTGCTATC AATTACGGCG
1 seq PTGFG67	TCATTAGTTC ATAGCCCATTA TATGGAGTTC CGCGTTACAT AACTTACGGT
1 seq PTGFG67	AAATGGCCCC CCTGGCTGAC CGCCCAACGA CCCCCGCCCA TTGACGTCAA
1 seq PTGFG67	TATAGACGTA TGTTCCCATA GTAACGCCAA TAGGCACTTT CCATTGACGT
1 seq PTGFG67	CAATGGGTGG AGTATTTACG GTAAACTGCC CACTGGCAG TACATCAAGT
1 seq PTGFG67	GTATCATATG CCAAGTACGC CCCCTATTGA CTTCAATGAC GGTAAATGCC
1 seq PTGFG67	CCGCCTGGCA TTATGCCCAG TACATGACCT TATGGGACTT TCCTACTTGG
1 seq PTGFG67	CAGTACATCT ACGTATTAGT CATCGCTATT ACCATCGTGA TGCGGTTTTC
1 seq PTGFG67	GCAGTACATC AATGGGCGTG GATAGCGGTT TGAATCAGG CGATTTCCAA
1 seq PTGFG67	GTCTCCACCC CATTGACGTC AATGGGAGTT TGTTTTGCCA CCAATATCAA
1 seq PTGFG67	CGCGACTTTC CAATATGTCT TAACCACTCC GCCCCATGCA CGCAATGGG
1 seq PTGFG67	CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT AAGCGAGCT CTCTGGCTAA
1 seq PTGFG67	CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGCCTTATCG AATTAATAC GACTCACTAT
1 seq PTGFG67	AGGGAGACCC AAGCTTGACC TCGAGCAAGC GGCCGCGACT CTACTAGAGG
1 seq PTGFG67	ATCTTTGTGA AGGACCTTA CTTCTGTGGT GTGACATAAT TGGACAACT
1 seq PTGFG67	ACCTTCAGAG ATTAAAGCT CTAAGGTRAA TATTAATTT TTAAGTGTAT
1 seq PTGFG67	AATGTGTTAA ACTACTGATT CTATTGTTT GTGTATTTA GATTCCAACC
1 seq PTGFG67	TATGGAACGT ATGAATGGGA GCACTGGTGG AATGCCTTTA ATGAGGAAAA
1 seq PTGFG67	CCTGTITTGC TCAGAGAAA TGCCATCTAG TGATGATGAG CTTACTGCTG

sequenz PTGFG67	13.12.19	21:02			
	950	970	980	990	1000
seq PTGFG67	ACTCACAACA TTCTACTCCT CCAAAAAAGA AGGAGAGCT AGAAGACCCC				
	1010	1020	1030	1040	1050
seq PTGFG67	AAGGACTTTC CTTCAGAATT GCTAAGTTT TTGAGTCATG CTGTGTTTAC				
	1060	1070	1080	1090	1100
seq PTGFG67	TAATAGAACT CTTCCTTGCT TTGCTATTTA CACCACAAG GAAAAAGCTG				
	1110	1120	1130	1140	1150
seq PTGFG67	CACTGCTATA CAAGAAAATT ATGGAATAAT ATTCTGTAAC CTTTATAAGT				
	1160	1170	1180	1190	1200
seq PTGFG67	AGGCATAACA GTTATAATCA TAACATACTG TTTTTCCTTA CTCCACACAG				
	1210	1220	1230	1240	1250
seq PTGFG67	GCATAGAGTG TCTGCTATTA ATAACATGC TCATAATTG TGTACCTTTA				
	1260	1270	1280	1290	1300
seq PTGFG67	GCTTTTAAAT TTGTAAAGGG GTTAATAAGG AATATTGAT GTATAGTCCC				
	1310	1320	1330	1340	1350
seq PTGFG67	TTGACTAGAG ATCATAATCA GCCATACCAC ATTTGTAGAG GTTTTACTTG				
	1360	1370	1380	1390	1400
seq PTGFG67	CTTTAAAAA CCTCCACAC CTCCCCCTGA ACCTCAACA TAAATGAAT				
	1410	1420	1430	1440	1450
seq PTGFG67	GCAATGTGTTG TTGTTAATT GTTTATGCA GCTTATATG GTTACAATA				
	1460	1470	1480	1490	1500
seq PTGFG67	AAGCAATAGC ATCACAATTT TCACAATAA AGCATTTTTT TCACTGCATT				
	1510	1520	1530	1540	1550
seq PTGFG67	CTAGTGTGG TTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA TGTCTGGATC				
	1560	1570	1580	1590	1600
seq PTGFG67	CCCCGCTACC CTCTAGAGCG AATTAATTCA CTGGCCGTGG TTTTACAACG				
	1610	1620	1630	1640	1650
seq PTGFG67	TCGTGACTGG GAAACCCTG GCGTTACCCA ACTTAATCGC CTTCAGCAC				
	1660	1670	1680	1690	1700
seq PTGFG67	ATCCCCCTTT CGCCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGCCCCG CACCGATCGC				
	1710	1720	1730	1740	1750
seq PTGFG67	CCTTCCCAAC AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GAATGGCGCC TGATGCGGTA				
	1760	1770	1780	1790	1800
seq PTGFG67	TTTTCTCCTT ACGCATCTGT GCGGTATTTC ACACCGCATA TGGTGCACTC				
	1810	1820	1830	1840	1850
seq PTGFG67	TCAGTACAAT CTGCTCTGAT GCGGCATAGT TAAGCCAGCC CCGACACCCG				
	1860	1870	1880	1890	1900
seq PTGFG67	CCAACACCCG CTGACGCGCC CTGACGGGCT TGTCTGCTCC CGGCATCCGC				

Sequenz pTGFG67 13.12.1 ; 21:02 Uhr					
	1910	1920	1930	1940	1950
1 seq pTGFG67	TTACAGACAA	GCTGTGACCG	TCTCCGGGAG	CTCC-TGTGT	CAGAGCTTTT
	1960	1970	1980	1990	2000
1 seq pTGFG67	CACCGTCATC	ACCGAARCCG	GCGAGACGAA	AGGCCCGGTA	CCAGCTTCGT
	2010	2020	2030	2040	2050
1 seq pTGFG67	AGCTAGAACA	TCATGTTCTG	CGATATCAGC	TTCGTAGCTA	GAACATCATG
	2060	2070	2080	2090	2100
1 seq pTGFG67	TTCTGGTACC	CCCCTCGTGA	TACGCCTATT	TTTATGGTT	AATGTCATGA
	2110	2120	2130	2140	2150
1 seq pTGFG67	TAATAATGCT	TTCTTAGACG	TCAGGTGGCA	CTTTTCGGGG	AAATGTGCGC
	2160	2170	2180	2190	2200
1 seq pTGFG67	GGAACCCCTA	TTTGTITATT	TTTCTAAATA	CATTCAAATA	TGTATCCGCT
	2210	2220	2230	2240	2250
1 seq pTGFG67	CATGAGACAA	TAACCCCTGAT	AAATGCTTCA	ATPATATGTA	AAAAGGAAGA
	2260	2270	2280	2290	2300
1 seq pTGFG67	GTATGAGTAT	TCAACATTTT	CGTGTGCGCC	TTATTCCTTT	TTTTCGGCA
	2310	2320	2330	2340	2350
1 seq pTGFG67	TTTTCCCTTC	CTGTTTTTGC	TCACCCAGAA	ACGCTGGTGA	AAGTAAAGA
	2360	2370	2380	2390	2400
1 seq pTGFG67	TGCTCAAGAT	CAGTGGGTG	CACGAGTGGG	TTACATCGAA	CTGGATCTCA
	2410	2420	2430	2440	2450
1 seq pTGFG67	ACAGCGGTAA	GATCCTTGAG	AGTTTTCGCC	CCGAGAACG	TTTCCAATG
	2460	2470	2480	2490	2500
1 seq pTGFG67	ATGAGCACTT	TTAAAGTTCT	GCTATGTGGC	GCGGTATTAT	CCCGTATTGA
	2510	2520	2530	2540	2550
1 seq pTGFG67	CGCCGGGCAA	GAGCAACTCG	GTCGCCGCAT	ACACTATTCT	CAGAATGACT
	2560	2570	2580	2590	2600
1 seq pTGFG67	TGGTTGAGTA	CTCACCAGTC	ACAGAAAGC	ATCTTACGGA	TGGCATGACA
	2610	2620	2630	2640	2650
1 seq pTGFG67	GTAAGAGAAT	TATGCAGTGC	TGCCATAACC	ATGAGTGATA	ACACTGCGGC
	2660	2670	2680	2690	2700
1 seq pTGFG67	CAACTTACTT	CTGACAACGA	TGGAGGACC	GAAGGACCTA	ACCGCTTTTT
	2710	2720	2730	2740	2750
1 seq pTGFG67	TGCACAACAT	GGGGGATCAT	GTA-CTCGCC	TTGATCGTTG	GGAACCGGAG
	2760	2770	2780	2790	2800
1 seq pTGFG67	CTGAATGAAG	CCATACCAA	CGACGAGCGT	GACACCACGA	TGCCTGTAGC
	2810	2820	2830	2840	2850

sequenz pTGFG67	13.12.199	21:02 Uhr		
	2250	2270	2290	2310
seq pTGFG67	CTTCCCGGCA	ACAATTAATA	GACTCGATGG	AGGCGGATAA
	2310	2330	2350	2370
seq pTGFG67	CCACTTCTGC	GCTCGGCCCT	TCCGGCTGGC	TGGTTTATTG
	2370	2390	2410	2430
seq pTGFG67	TGGAGCCCGT	GAGCGTGGGT	CTCGCGGTAT	CATTCCAGCA
	2430	2450	2470	2490
seq pTGFG67	ATGGTAAGCC	CTCCCGTATC	GTAATTATCT	ACACGACGGG
	2490	2510	2530	2550
seq pTGFG67	ACTATGGATG	AACGAAATAG	ACAGATCGCT	GAGATAGGTG
	2550	2570	2590	2610
seq pTGFG67	TAAGCATTTG	TAACTGTCAG	ACCAAGTTTA	CTCATATATA
	2610	2630	2650	2670
seq pTGFG67	ATTTAARACT	TCATTTTAA	TTTAAAAGGA	TCTAGGTGAA
	2670	2690	2710	2730
seq pTGFG67	GATAATCTCA	TGACCAAAAT	CCCTTAACGT	GAGTTTTCGT
	2730	2750	2770	2790
seq pTGFG67	GTCAGACCCC	GTAAGAAAAG	TCAAAGGATC	TTCTTGAGAT
	2790	2810	2830	2850
seq pTGFG67	TGCGCGTAAT	CTGCTGCTTG	CAAACAAAAA	AACCACCGCT
	2850	2870	2890	2910
seq pTGFG67	GTTTGTTTGC	CGGATCAAGA	GCTACCAACT	CTTTTCCGA
	2910	2930	2950	2970
seq pTGFG67	CTTCAGCAGA	GCGCAGATAC	CAAATACTGT	TCTTCTGTGT
	2970	2990	3010	3030
seq pTGFG67	TAGGCCACCA	CTCAAGAAC	TCTGTAGCAC	CGCCTTATA
	3030	3050	3070	3090
seq pTGFG67	CTAATCCTGT	TACCAGTGGC	TGCTGCCAGT	GGCGATAGT
	3090	3110	3130	3150
seq pTGFG67	CGGGTGGAC	TCAAGACGAT	AGTTACCGGA	TAAGGCTCAG
	3150	3170	3190	3210
seq pTGFG67	GAACGGGGGG	TTCGTGCACA	CAGCCAGCT	TGGAGCTAAC
	3210	3230	3250	3270
seq pTGFG67	GAACTGAGAT	ACCTACAGCG	TGAGCTATGA	GAAAGCCCA
	3270	3290	3310	3330
seq pTGFG67	AGGGAGAAAG	GCGGACAGGT	ATCCGGTAAG	CGGCACCGTC
	3330	3350	3370	3390
seq pTGFG67	AGCGCACGAG	GGAGCTTCCA	GGGGGAAACG	CCTGCTATCT
	3390	3410	3430	3450

Sequenz pTGFG67 13.12.19. 21:02 Uhr

	3810	3820	3830	3840	3850
seq pTGFG67	GTCGGGTTTC	GCCACCTCTG	ACTTGAGCGT	CGATTTTGT	GATGCTCGTC
	3860	3870	3880	3890	3900
seq pTGFG67	AGGGGGCGCG	AGCCTATCGA	AAAACGCCAG	CAACGCGGCC	TTTTTACGGT
	3910	3920	3930	3940	3950
seq pTGFG67	TCCTGGCCTT	TTGCTGGCCT	TTGCTCACA	TGTTCTTTCC	TGCGTTATCC
	3960	3970	3980	3990	4000
seq pTGFG67	CCTGATTCTG	TGGATAACCG	TATTACCGCC	TTTGAGTGAG	CTGATACCGC
	4010	4020	4030	4040	4050
seq pTGFG67	TCGCCGCAGC	CGAACGACCG	AGCGCAGCGA	GTCAGTGAGC	GAGGAAGCGG
	4060	4070	4080	4090	4100
seq pTGFG67	AAGAGCGCCC	AATACGCAAA	CCGCCTCTCC	CCGCGCGTTG	GCCGATTTCAT
	4110	4120	4130	4140	4150
seq pTGFG67	TAATGCAGCT	GGCAGGACAG	GTTTCCCGAC	TGAAAGCGG	GCAGTGAGCG
	4160	4170	4180	4190	4200
seq pTGFG67	CAACGCAATT	AATGTGAGTT	AGCTCACTCA	TTAGGCACCC	CAGGCTTTAC
	4210	4220	4230	4240	4250
seq pTGFG67	ACTTTATGCT	TCCGGCTCGT	ATGTTGTGTG	GAATTGTGAG	CGGATAACAA
	4260	4270	4280	4290	4300
seq pTGFG67	TTTCACACAG	GAAACAGCTA	TGACCATGAT	TACGCCAAGC	TCTCTAGAGC
	4310	4320	4330	4340	4350
seq pTGFG67	TCTAGAGCTC	TAGAGCTCTA	GAGAGCTTGC	ATGCCTGCAG	GTCG

Abbildung 48



Abbildung 48a



Abbildung 48b



Abbildung 48c

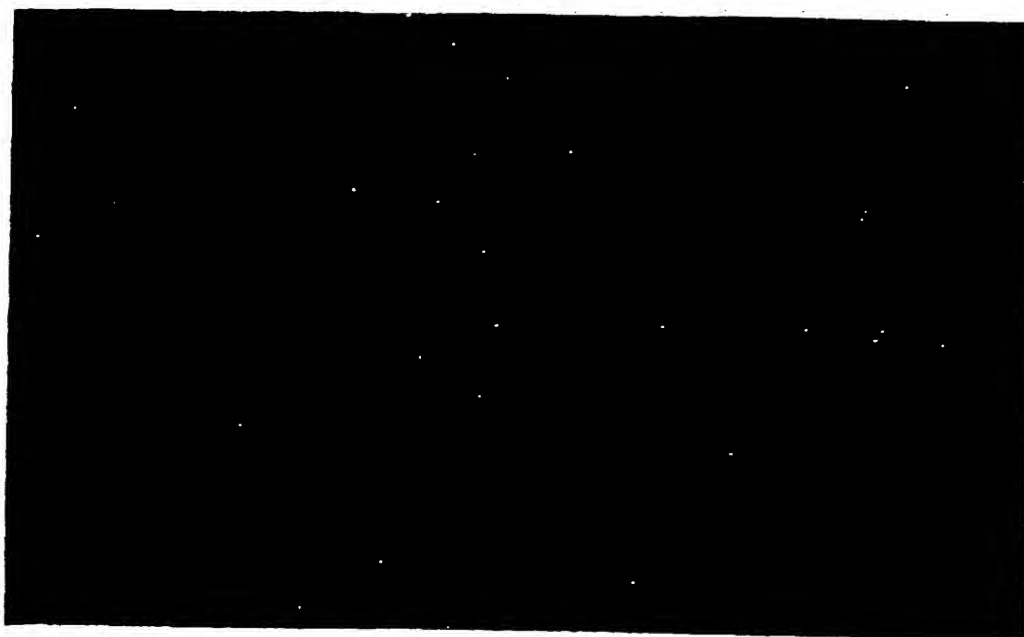


Abbildung 48d

Korrespondierende licht- (a und c) und flureszenzmikroskopische (b und d) Aufnahmen von HeLa-Zellen, die mit pTGFG5 (a und b) bzw. pTGFG20 (c und d) transfiziert wurden.